

Studien zur Regulation und Funktion
der Polo-Kinase Cdc5 im Zellteilungszyklus
der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Lea Arnold

aus
Regensburg

im Jahr 2012

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

04. Dezember 2012

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Unterschrift:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Regensburg, Dezember 2012

Was wir wissen ist ein Tropfen,
was wir nicht wissen ein ganzer Ozean.

Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Zusammenfassung	14
2 Abstract	16
3 Einleitung	18
3.1 Der Zellteilungszyklus der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	18
3.2 Regulation des Zellteilungszyklus in <i>S. cerevisiae</i>	21
3.2.1 Regulation des Zellteilungszyklus durch die zyklinabhängige Kinase	21
3.2.2 Regulation des Zellteilungszyklus durch Ubiquitin-vermittelte Proteindegradation	23
3.2.2.1 Der SCF-Komplex	24
3.2.2.2 <i>Anaphase promoting complex</i> (APC)	25
3.2.3 Regulation des Austritts aus der Mitose	27
3.2.3.1 Der Nukleolus – Ort der Cdc14-Inaktivierung	28
3.2.3.2 Cdc14-Aktivierung durch FEAR und MEN	28
3.3 Das Spindelkontrollsystem	32
3.3.1 Kinetochorstruktur und Aktivierung des SAC	32
3.3.2 Bildung des MCC und APC-Inhibierung	34
3.3.3 Inaktivierung des SAC	36
3.3.4 Mps1 im Spindelkontrollsystem	37
3.4 Cdc5 – die Polo-Kinase in <i>S. cerevisiae</i>	38
3.4.1 Regulation von Cdc5	40
3.4.2 Funktionen von Cdc5	42
4 Ergebnisse	45
4.1 Regulation von Cdc5 durch den N-terminalen Bereich	45
4.2 Instabilität und Lokalisation von Cdc5N80-GFP	47
4.2.1 Cdc5N80 ist hinreichend für Instabilität und Lokalisation im Zellkern	47
4.2.2 KEN-Box und D-Boxen tragen zur Instabilität von Cdc5 bei	50
4.2.3 Kernlokalisation von Cdc5N80-GFP ist notwendig für Instabilität	55

4.2.4	Degradation von Cdc5N80-GFP ist im Nukleoplasma effektiver.....	59
4.3	Regulation von Cdc5 durch Cdk1-abhängige Phosphorylierung	63
4.3.1	Komplementation von <i>cdc5-Δ</i> durch <i>cdc5pm1/2</i> ist unvollständig.....	63
4.3.2	Mutation der N-terminalen Phosphorylierungsstellen hat keinen Einfluss auf die Instabilität von Cdc5	68
4.3.3	Mutation der N-terminalen Phosphorylierungsstellen hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Cdc5	69
4.3.4	Genetische Interaktionen von <i>cdc5mp1/2</i>	71
4.3.4.1	Synthetische Letalität von <i>cdc5pm1/2</i> mit <i>clb2-Δ</i> und <i>CDC14^{HA10}</i>	72
4.3.4.2	Überexpression von Cdc14 supprimiert den <i>cdc5pm1/2</i> -Phänotyp	73
4.3.5	Cdc14-Freisetzung ist in der <i>cdc5pm1/2</i> -Mutante beeinträchtigt.....	75
4.3.6	Mutation der N-terminalen Phosphorylierungsstellen hat einen Einfluss auf die Kinase-Aktivität von Cdc5 <i>in vivo</i>	77
4.4	Cdc5 im Spindelkontrollsystem	82
4.4.1	Cdc5 ist ein Gegenspieler des Spindelkontrollsystems	83
4.4.2	Erhöhte Mengen von Cdc5 lösen den MCC auf.....	85
4.4.3	Erhöhte Mengen von Cdc5 verhindern nicht die Interaktion von Mad1 mit Mad2	87
4.4.4	Erhöhte Mengen von Cdc5 beeinflussen die Kinetochor-Lokalisation der SAC-Komponenten.....	88
4.4.4.1	Erhöhte Mengen von Cdc5 verringern die Kinetochor-Lokalisation von Mad1	89
4.4.4.2	Erhöhte Mengen von Cdc5 verringern die Kinetochor-Lokalisation von Mad2 und Bub3	92
4.4.4.3	Cdc20 co-lokalisiert mit unbesetztem Kinetochor	95
4.4.5	Kinetochor-Lokalisation von SAC-Komponenten ist voneinander abhängig ..	96
4.4.6	Potentielle Zielproteine von Cdc5 im Spindelkontrollsystem.....	99
4.4.6.1	Ndc80	99
4.4.6.2	Slk19.....	100
4.4.6.3	Mps1	102
4.4.7	Regulation von Cdc5 im Spindelkontrollsystem	105
5	Diskussion.....	107
5.1	Regulation von Cdc5 durch die N-terminale Domäne (N80).....	107
5.1.1	N80 vermittelt Instabilität und Kernlokalisierung	107

5.1.2	Kernlokalisierung vermittelt Instabilität in G1	110
5.1.3	N80 stimuliert Kinase-Aktivität von Cdc5 <i>in vivo</i>	112
5.1.4	N-terminale Domäne ist in Hefen konserviert.....	115
5.2	Cdc5 – ein negativer Regulator des Spindelkontrollsystems	116
5.2.1	MCC-Bildung am unbesetzten Kinetochor	116
5.2.2	Inaktivierung des SAC durch Cdc5	117
5.2.3	Wirkungsweise von Cdc5 im SAC	119
6	Methoden.....	122
6.1	Arbeiten mit Bakterien	122
6.1.1	Kultivierung von DH5 α -Zellen	122
6.1.2	Transformation von DH5 α -Zellen.....	122
6.1.2.1	Herstellung elektrokompenter DH5 α -Zellen	122
6.1.2.2	Transformation von elektrokompenten Zellen mittels Elektroporation ..	122
6.2	Arbeiten mit der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	123
6.2.1	Kultivierung von Hefestämmen in Flüssigmedium.....	123
6.2.2	Synchronisation von Hefekulturen	123
6.2.2.1	Synchronisation durch das Paarungspheromon α -Faktor	124
6.2.2.2	Synchronisation durch das Spindelgift Nocodazol.....	124
6.2.2.3	Synchronisation durch die Deletion von <i>CDC20</i>	124
6.2.3	Aufbewahrung von Hefestämmen	125
6.2.4	Kreuzung haploider Hefestämme	125
6.2.5	Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse.....	125
6.2.6	Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode	126
6.2.7	Integration von Plasmid-DNA ins Hefegenom	127
6.2.7.1	Integration am Markergen mittels integrativem Plasmid	127
6.2.7.2	Integration am Markergen mittels <i>disintegrator</i> Plasmid	127
6.2.8	Wachstumstest von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihe	129
6.3	Fixierung, Durchflusszytometrie und Mikroskopie von Hefezellen	129
6.3.1	Ethanolfixierung von Hefezellen.....	129
6.3.2	DNA-Färbung mit Sytox Green und Durchflusszytometrie.....	129
6.3.3	Mikroskopie von lebenden Zellen	130
6.4	Genetische und molekularbiologische Methoden.....	131
6.4.1	Präparation von genomischer DNA aus Hefezellen	131
6.4.2	Polymerasekettenreaktion.....	132

INHALTSVERZEICHNIS

6.4.2.1	PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	132
6.4.2.2	PCR zur Genommanipulation.....	133
6.4.2.3	Gezielte Mutagenese eines Gens mittels PCR.....	134
6.4.2.4	Paarungstyp-Bestimmung mittels Kolonie-PCR.....	135
6.4.3	Restriktionsverdau von DNA	136
6.4.4	Gelelektrophorese von DNA	136
6.4.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	137
6.4.5.1	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	137
6.4.5.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionsverdau ..	137
6.4.6	Ligation.....	137
6.4.7	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	138
6.4.7.1	Plasmidschnellisolierung.....	138
6.4.7.2	Säulenreinigung von Plasmid-DNA	138
6.4.8	Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrads einer DNA-Lösung	138
6.4.9	Sequenzierung	138
6.5	Proteinanalytische Methoden	139
6.5.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Hefezellen.....	139
6.5.2	Proteinkonzentrations-Bestimmung nach Bradford	139
6.5.3	Immunpräzipitation	139
6.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	140
6.5.5	Westernblot und immunologischer Nachweis von Proteinen.....	141
7	Material	143
7.1	Hefestämme.....	143
7.2	Plasmide und Vektoren.....	151
7.3	Oligonukleotide	153
7.4	Nukleinsäuren.....	156
7.5	Enzyme und Proteine.....	156
7.6	Antikörper und Seren	157
7.6.1	Primäre Antikörper und Seren.....	157
7.6.2	Sekundäre Antikörper.....	157
7.7	Chemikalien.....	158
7.8	Sonstige Materialien	160
7.9	Geräte.....	161
7.10	Software und Datenbanken.....	163

INHALTSVERZEICHNIS

7.11	Medien, Puffer und Lösungen	164
7.11.1	Bakterienmedien	164
7.11.2	Hefemedien	165
7.11.3	Puffer und Lösungen	166
8	Literaturverzeichnis	170
9	Anhang.....	182
9.1	Abbildungsverzeichnis	182
9.2	Tabellenverzeichnis	183
	Lebenslauf	184
	Danke	186

Abkürzungsverzeichnis

1C	einfacher DNA-Gehalt (vor der Replikation der DNA)
2C	doppelter DNA-Gehalt (nach der Replikation der DNA)
α -	anti
α -Faktor	alpha-Faktor
Δ	Deletion
ΔN	N-terminale Verkürzung von Cdc5 um die ersten 72 Aminosäuren
μ	Mikro (10^{-6})
μF	Mikrofarad, Einheit der elektrischen Kapazität
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
$^{\circ}C$	Grad Celsius
Ω	Ohm
A	
A	Ampere
Abb.	Abbildung
APC	<i>anaphase promoting complex</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B	
BUB	<i>budding uninhibited by benzimidazole</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	
c	Zenti (10^{-2})
Cak	<i>Cdk activating kinase</i>
CaURA3	<i>Candida albicans URA3</i>
CDC	<i>cell division cycle</i>
Cdk	zyklinabhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
CHX	Cycloheximid
Cki	<i>Cdk inhibitor</i>
clonNAT	Nourseothricin
cm	Zentimeter
cMad2	<i>closed Mad2-Konformation</i>
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CPC	<i>chromosomal passenger complex</i>
C-terminal	carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Ende einer Polypeptidkette
cyc	asynchron
D	
d	Abstand (<i>distance</i>)
D	Glukose
D-Box	<i>destruction box</i>
DIC	<i>differential interference contrast</i>
DMFA	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxyribonukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dSPK	Spindelpolkörper der Tochterzelle (<i>daughter</i>)
DTT	Dithiothreitol

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

E	
E	Expression
eCdc5	endogenes Cdc5
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
EtOH	Ethanol
F	
5-FOA	5-Fluororotsäure
F	Farad
FEAR	<i>cdc fourteen early anaphase release</i>
fTF	<i>forkhead</i> Transkriptionsfaktor
G	
g	Gramm
G	Galaktose
G418	Kanamycin
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosin-Diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosin-Triphosphat
H	
h	Stunde (<i>hour</i>)
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin-Epitop
HMG	<i>high mobility group</i>
I	
IP	Immunpräzipitation
K	
k	Kilo (10 ³)
kb	Kilobase
kV	Kilovolt
L	
l	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i> , Bakterienmedium
M	
m	Milli (10 ⁻³) oder ohne Zusatz: Meter
M	Molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
MAD	<i>mitotic arrest deficient</i>
MCC	<i>mitotic checkpoint complex</i>
MEN	<i>mitotic exit network</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
MT	Mikrotubuli
MYC	c-myc-Epitop
N	
n	Nano (10 ⁻⁹) oder ohne Zusatz: Anzahl
N80	80 N-terminalen Aminosäuren von Cdc5
NES	Kernexportsequenz (<i>nuclear export sequence</i>)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisationssequenz (<i>nuclear localization sequence</i>)
nm	Nanometer
NOC	Nocodazol
N-terminal	amino-terminal
O	
OD ₅₉₅	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
oMad2	<i>open</i> Mad2-Konformation
P	
p	Pico (10 ⁻¹²)
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBD	Polo-Box-Domäne
<i>pCDC5</i>	endogener Promotor des Gens <i>CDC5</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
<i>pGAL1</i>	Galaktose-induzierbarer Promotor
<i>pGALL</i>	abgeschwächter Galaktose-induzierbarer Promotor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Plk	<i>polo-like kinase</i>
pm	mutierte Cdk1-Konsensussequenz in Cdc5
<i>pMET3</i>	Methionin-reprimierbarer Promotor
pmol	Picomol
PP1	Protein-Phosphatase 1
<i>pTEF2</i>	konstitutiver Promotor des Gens <i>TEF2</i>
R	
R	Raffinose
rDNA	ribosomale DNA
RENT	<i>regulator of nucleolar silencing and telophase</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNA Pol I	RNA Polymerase I
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	
s	Sekunde
SAC	Spindelkontrollsystem (<i>spindle assembly checkpoint</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCF	Ubiquitinligasekomplex aus Skp1, Cullin und F-Box Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH	Stammhintergrund
SPK	Spindelpolkörper
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
T	
t	Zeit (<i>time</i>)
<i>tADH1</i>	Terminator des Gens <i>ADH1</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
<i>tCYC1</i>	Terminator des Gens <i>CYC1</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPR	<i>tetratricopeptide repeats</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

U	
U	Unit (Enzymmenge)
ÜE	Überexpression
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	
V	Volt
W	
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp
X	
XY	Hefe-Vollmedium
Z	
z	Ebene

Aminosäuren und Nukleotide werden nach den internationalen Regeln abgekürzt. Die Schreibweise der Gene und Proteine richtet sich nach der Hefenomenklatur. Gängige Fachausdrücke aus dem Englischen wurden übernommen, wenn eine deutsche Entsprechung nicht existiert oder nicht gebräuchlich ist und sind *kursiv* dargestellt.

1 Zusammenfassung

Die Polo-Kinasen sind multi-funktionelle Regulatoren des eukaryotischen Zellteilungszyklus. Sie sind hoch konserviert und gehören zu den Serin/Threonin-Kinasen. Während sich im N-terminalen Bereich die katalytische Domäne befindet, enthält der C-terminale Bereich die charakteristische Polo-Box-Domäne. Sie vermittelt die Substrat-Bindung und die subzelluläre Lokalisation der Polo-Kinasen. Der einzige Vertreter der Familie der Polo-Kinasen in *Saccharomyces cerevisiae* ist Cdc5. Cdc5 und die zyklinabhängige Kinase Cdk1 kooperieren hinsichtlich ihrer Aktivität miteinander. Zum einen fördern Cdc5 und Cdk1 zu Beginn der Mitose die Transkription des *CLB2*-Genclusters, zu dem das Zyklin *CLB2* und *CDC5* selbst gehören und zum anderen trägt Cdc5 zur Destabilisierung eines mitotischen Cdk1-Inhibitors bei. Während der Mitose fördert Cdc5 die Kondensation sowie die Trennung der Schwesterchromatiden. Als Komponente des FEAR- und des MEN-Signalwegs ist Cdc5 an der Aktivierung der Phosphatase Cdc14 und am Austritt aus der Mitose beteiligt. Die präzise Regulation der Cdc5-Aktivität ist für einen reibungslosen Ablauf des Zellteilungszyklus erforderlich.

Durch phasenspezifische Transkription und Ubiquitin-vermittelte Proteolyse fluktuiert der Proteinlevel von Cdc5 während des Zellteilungszyklus. Für die APC^{Hct1}-vermittelte Degradation ist die N-terminale Domäne von Cdc5 notwendig. Diese Arbeit zeigt mittels *live-cell imaging* und *in vivo* Degradationsanalysen, dass die N-terminale Domäne nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für die Instabilität sowie die Kernlokalisierung ist. Die KEN-Box konnte als das entscheidende Degron identifiziert werden, während die vermeintlichen D-Boxen zur Kernlokalisierung beitragen. Insgesamt zeigten die Degradationsstudien, dass die Lokalisation im Zellkern wichtig für die APC^{Hct1}-vermittelte Proteolyse ist.

Neben der regulierten Instabilität wird die Aktivität von Cdc5 durch Cdk1-abhängige Phosphorylierung des Threoninrests T242 innerhalb des Aktivierungsloops der Kinase-Domäne kontrolliert. Diese Arbeit zeigt, dass die Konsensussequenzen für die Cdk1-Phosphorylierung im N-terminalen Bereich zusätzlich für die normale biologische Funktion von Cdc5 wichtig sind. Mit Hilfe von genetischen Interaktionsstudien und Analyse der *in vivo* Phosphorylierung von Zielproteinen wie Cdc14 und Bfa1 konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere die Cdc14-Aktivierung durch die Phosphorylierung der N-terminalen Domäne von Cdc5 reguliert wird.

Zusätzlich zu den bekannten positiven Funktionen zum Fortschreiten der Mitose weisen die Ergebnisse dieser Arbeit Cdc5 eine Rolle als negativer Regulator des Spindelkontrollsystems (SAC) zu. In dieser Arbeit konnte mittels Co-Immunpräzipitation gezeigt werden, dass erhöhte Mengen von Cdc5 die Interaktion der SAC-Komponente Mad2 mit dem APC-Aktivator Cdc20 verhinderten. Des Weiteren verringerten erhöhte Mengen von Cdc5 die Lokalisation der SAC-Komponente Mad1 am unbesetzten Kinetochor. Als Konsequenz daraus konnte auch die Lokalisation von Mad2 und Bub3 am unbesetzten Kinetochor bei erhöhten Mengen von Cdc5 nicht aufrechterhalten werden. Cdc5 wurde als Gegenspieler der SAC-Kinase Mps1, die zur Aktivierung des Spindelkontrollsystems notwendig ist, identifiziert. Eine mögliche direkte Wirkung von Cdc5 auf Mps1 ist denkbar, da die elektrophoretische Mobilität von Mps1 in der Westernblot-Analyse durch die Überexpression von Cdc5 reduziert war.

Zusammengenommen weisen alle diese Ergebnisse darauf hin, dass die N-terminale Domäne von Cdc5 sowohl negative als auch positive Eigenschaften hat. Einerseits ist der N-terminale Bereich notwendig und hinreichend für die Instabilität in G1 und andererseits sind die N-terminalen Konsensussequenzen für die Cdk1-Phosphorylierung wichtig für die biologische Funktion. Darüber hinaus konnte Cdc5 als negativer Regulator des Spindelkontrollsystems identifiziert werden, wobei die präzisen Zielproteine noch bestimmt werden müssen.

2 Abstract

The polo-like kinases (Plks) are multi-functional regulators of the eukaryotic cell division cycle. They are highly conserved and belong to the serine/threonine-kinases. Plks are characterized by their C-terminal polo box domain, which recognizes phosphorylated target proteins and contributes to the subcellular localization of Plks. The catalytic domain is localized within the N-terminal region. Cdc5 is the only member of the polo kinase family in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cdc5 and the cyclin-dependent kinase Cdk1 cooperate with respect to their biological and enzymatic activity. At the beginning of mitosis Cdc5 and Cdk1 stimulate transcription of the *CLB2* gene cluster, which includes the cyclin *CLB2* and *CDC5* itself. In addition, Cdc5 contributes to destabilization of a mitotic Cdk1 inhibitor. During mitosis condensation of chromosomes is regulated and separation of sister chromatids is facilitated by Cdc5. As part of the FEAR and the MEN pathways, Cdc5 promotes activation of the phosphatase Cdc14 and the exit from mitosis. Thus, tight control of Cdc5 activity is important for an accurate cell division cycle.

By phase-specific gene transcription and ubiquitin-mediated proteolysis, protein levels of Cdc5 fluctuate in a cell cycle-dependent manner. Instability of Cdc5 depends on the ubiquitin ligase APC^{Hct1} and requires the N-terminal domain. By using live-cell imaging and *in vivo* degradation studies, it was shown that the N-terminal region is not only necessary but also sufficient for instability and nuclear localization. The KEN box was identified as the key degron, whereas the potential D boxes contributed to nuclear localization of Cdc5N80. In addition, data of this work suggest that nuclear localization of APC^{Hct1} target proteins is important for their degradation.

Aside from regulated instability, the activity of Cdc5 is controlled via Cdk1-dependent phosphorylation of the T-loop residue T242 in the catalytic domain. This work shows that consensus sites for phosphorylation by Cdk1 within the N-terminal domain are also important for the normal function of Cdc5. Analysis of genetic interactions and *in vivo* phosphorylation of target proteins like Cdc14 and Bfa1 indicated that activation of Cdc14 in particular is regulated by the phosphorylation of the N-terminal domain of Cdc5.

In addition to the already known positive functions in promoting progression through mitosis the data of this work assign to Cdc5 the role of a negative regulator of the spindle assembly checkpoint (SAC). Via coimmunoprecipitation it was shown that high levels of Cdc5 prevent interaction of the SAC component Mad2 with the APC activator Cdc20. Moreover, localization of the SAC component Mad1 at the unattached kinetochore was prevented by

ABSTRACT

high levels of Cdc5. As a consequence of this, localization of Mad2 and Bub3 at the unattached kinetochore was neither maintained in the presence of high levels of Cdc5. Cdc5 was found to counteract the SAC kinase Mps1, which is required for activation of the SAC. Mps1 might be a direct target protein of Cdc5 since the electrophoretic mobility of Mps1 was reduced by Cdc5 overexpression in western blot analysis.

All together the data show that the N-terminal domain of Cdc5 has negative and positive functions. On the one hand, the N-terminal region was required and sufficient for instability in G1. On the other hand, the N-terminal consensus sites for phosphorylation by Cdk1 were important for normal function of Cdc5. In addition to this, Cdc5 was identified as a negative regulator of the spindle assembly checkpoint, but the direct target proteins of Cdc5 have yet to be discovered.

3 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit soll die Regulation der Polo-Kinase Cdc5 im Zellteilungszyklus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* sowie deren Funktion im Spindelkontrollsystem untersucht werden. Die Bäckerhefe ist ein einzelliger eukaryotischer Organismus und vermehrt sich durch mitotische Teilung, wobei eine etwas größere Mutter- und eine kleinere Tochterzelle entstehen. Dabei ist die Generationszeit von *S. cerevisiae* relativ kurz und beträgt unter guten Nährstoffbedingungen nur ca. 90 bis 120 min (Sherman, 1998). Ein weiterer Vorteil der Bäckerhefe ist die einfache Kultivierung im haploiden Zustand, wodurch Auswirkungen genetischer Veränderungen leicht analysiert werden können. Aufgrund der vollständigen Sequenzierung des Hefegenoms (Goffeau *et al.*, 1996) und der in Hefe häufig Auftretenden homologen Rekombination ist es leicht möglich, Hefestämme genetisch zu manipulieren und so Stämme mit gewünschten genetischen Eigenschaften herzustellen (Morgan, 2007). Viele grundlegende zelluläre Prozesse sind in Eukaryoten hoch konserviert, wodurch sich die gewonnenen Erkenntnisse oft auf höhere Eukaryoten bis hin zum Menschen übertragen lassen (Dolinski und Botstein, 2007). Diese Eigenschaften und die gut etablierten Methoden machen die Bäckerhefe *S. cerevisiae* zu einem beliebten Modellorganismus der molekularbiologischen Forschung, insbesondere der Zellzyklusforschung.

3.1 Der Zellteilungszyklus der Hefe *S. cerevisiae*

Der Zellteilungszyklus dient der Entstehung zweier, genetisch identischer Tochterzellen. Dabei wird durch einen kontrollierten Ablauf das genetische Material verdoppelt und auf die Tochterzellen verteilt. Anschließend werden die beiden Zellen voneinander getrennt.

Die Identifizierung von Zellteilungsmutanten in *S. cerevisiae*, den *cell division cycle* (*cdc*)-Mutanten, ermöglichte es, den Ablauf des Zellzyklus genauer zu analysieren (Hartwell *et al.*, 1974; Hartwell, 1978). *CDC*-Gene sind essentiell und deren Verlust führt zu zellzyklus-spezifischem Arretieren der Zellen. Die Analyse dieser Zellzyklus-Arreste gab erste Hinweise darauf, dass späte Ereignisse des Zellteilungszyklus von der Vollendung früher Prozesse abhängig sind (Morgan, 2007). Der eukaryotische Zellzyklus lässt sich in die Synthese-Phase (S-Phase), die der Replikation der DNA dient, und die Mitose (M-Phase), in der die Trennung der Schwesterchromatiden erfolgt, unterteilen. Durch sogenannte *gap*-Phasen (G1 und G2) sind diese Phasen voneinander getrennt (Abb. 3.1).

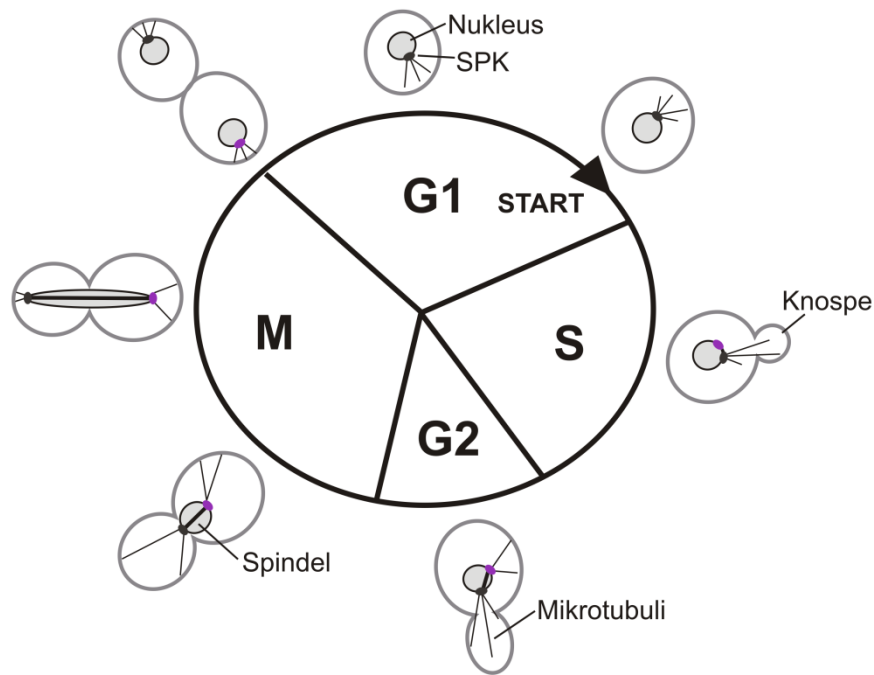


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des Zellteilungszyklus in *S. cerevisiae*

Der eukaryotische Zellteilungszyklus lässt sich in die G1-, S-, G2- und M-Phase unterteilen. In der G1-Phase wächst die Zelle bis zu einer kritischen Größe, die die Voraussetzung für das Durchschreiten des START-Kontrollpunkts ist. Mit Beginn der S-Phase bildet sich eine Knospe und die DNA wird repliziert. Außerdem verdoppelt sich der Spindelpolkörper (SPK). In *S. cerevisiae* ist keine typische G2-Phase vorhanden. Vor dem Eintritt in die M-Phase wandern die SPK zu den entgegengesetzten Polen des Zellkerns und bilden die mitotische Spindel aus. Während der M-Phase werden die Chromosomen getrennt. Die Zytokinese schließt die M-Phase ab, wodurch eine Mutter- und eine Tochterzelle entstehen, die dann erneut in den Zellteilungszyklus eintreten können.

Der Eintritt in den Zellteilungszyklus der Bäckerhefe *S. cerevisiae* erfolgt durch Überschreiten des START Kontrollpunkts am Ende der G1-Phase. Die G1-Phase wird auch als Wachstumsphase bezeichnet, da für den Eintritt in den Zellteilungszyklus eine kritische Zellgröße erreicht werden muss. Neben der Zellgröße beeinflussen auch äußere Faktoren, wie das Angebot an Nährstoffen oder die Anwesenheit von Paarungspheromonen die Dauer dieser Phase. Auf Nährstoffmangel reagiert die Zelle durch Verharren in der G1-Phase. Außerdem können sich haploide Zellen unterschiedlichen Paarungstyps (*MATa* bzw. *MATα*) in der G1-Phase paaren. Dazu sezernieren sie Paarungspheromone, die durch Bindung an Rezeptoren der Zelloberfläche eine Signalkaskade aktivieren. Dies hat ebenfalls einen Arrest in G1 zur Folge, um die Zell- und Kernfusion zu ermöglichen. Sind dagegen alle Voraussetzungen erfüllt, wird der START überschritten und die Zelle durchläuft irreversibel den gesamten Zellzyklus. Erst in der nächsten G1-Phase kann die Zelle wieder auf ein sich verschlechterndes Nährstoffangebot oder Paarungspheromone reagieren (Herskowitz, 1988).

Auf die G1-Phase folgt die S-Phase. Während der S-Phase findet die Replikation der DNA statt und es bildet sich eine Knospe. Am Ort der Knospenbildung polarisiert das Aktinzytoskelett der Zelle und steuert so das apikale Wachstum der Knospe (Pruyne *et al.*, 2004). Zudem wird der Spindelpolkkörper (SPK) dupliziert, das Mikrotubuli-Organisationszentrum der Hefe, welches dem Zentrosom höherer Eukaryoten entspricht. Die beiden entstandenen SPK wandern anschließend zu den entgegengesetzten Polen des Zellkerns und bilden zwischen sich die mitotische Spindel aus. Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten ist in *S. cerevisiae* keine typische G2-Phase vorhanden (Lew, 2003; Tanaka *et al.*, 2005). Zwischen S- und M-Phase kommt es zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts, wodurch ein Wechsel zu isotropem Wachstum vollzogen wird. Das isotope Wachstum setzt sich auch noch anfangs in der M-Phase fort. Die M-Phase dient der Chromosomentrennung und kann wiederum in fünf Subphasen unterteilt werden. Im Gegensatz zu anderen Eukaryoten wird in *S. cerevisiae* während der Mitose die Kernhülle nicht aufgelöst, was als Endomitose bezeichnet wird. In der Prophase wird zunächst das Chromatin mit Hilfe von Kondensin-Komplexen kompaktiert, um eine spätere korrekte Trennung der Chromosomen zu gewährleisten. Das Nukleosom ist die kleinste Einheit der Chromatinstruktur und besteht aus einem Histon-Oktamer (je zwei H2A, H2B, H3 und H4), um das die DNA gewickelt ist und dem Histon H1, das dem umwickelten Oktamer aufliegt. In der Metaphase ist die Kondensation der Chromosomen abgeschlossen und die Schwesterchromatiden werden über Kohäsin-Komplexe zusammengehalten. An der Zentromer-Region der Chromosomen lagern große Proteinkomplexe an, die Kinetochore, die der Mikrotubuli-Anheftung dienen. Die Mikrotubuli der gebildeten mitotischen Spindel, die sich bipolar an die Kinetochore der Schwesterchromatiden anheften, werden als Kinetochor-Mikrotubuli (kMT) bezeichnet und die interpolaren Mikrotubuli (ipMT) verbinden die SPK miteinander. Dabei kommt es nicht wie in höheren Eukaryoten zur Ausbildung einer Metaphaseplatte (Straight *et al.*, 1997), aber die Zentromer-Regionen lagern sich zusammen (Tanaka *et al.*, 2005). Im Zytoplasma befinden sich die astralen Mikrotubuli, die mit dem Zellkortex interagieren und für die Ausrichtung des Zellkerns entlang der Mutter-Tochter-Achse verantwortlich sind (Segal und Bloom, 2001). Beim Übergang von der Meta- zur Anaphase werden durch Spaltung der Kohäsin-Komplexe (Cohen-Fix und Koshland, 1999) und Depolymerisation der kMT die Schwesterchromatiden voneinander getrennt. Zugleich verlängern sich die ipMT bis die Spindel maximal elongiert ist. Haben die Chromatiden die entgegengesetzten SPK erreicht, ist die Trennung der Chromosomen abgeschlossen. In der Telophase werden die Chromosomen schließlich wieder dekontensiert und die Spindel depolymerisiert. Als letztes schließt die

Zytokinese die M-Phase ab, wobei Mutter- und Tochterzelle voneinander getrennt werden. Die Trennung der Zellen erfolgt durch Kontraktion des Aktin-Myosin-Rings und Synthese einer neuen Zellwand zwischen den Zellkörpern (Pollard, 2010). Anschließend können beide Zellen in einen neuen Zellteilungszyklus eintreten. Die entstandene Tochterzelle ist etwas kleiner als die Mutterzelle, weshalb von einer asymmetrischen Zellteilung gesprochen wird.

3.2 Regulation des Zellteilungszyklus in *S. cerevisiae*

Um einen fehlerfreien Ablauf des Zellteilungszyklus zu gewährleisten, bedarf es einer zeitlichen Kontrolle der phasenspezifischen Prozesse. Kontrollmechanismen sorgen dafür, dass bestimmte Ereignisse erst abgeschlossen werden müssen, um in die nächste Phase eintreten zu können (Hartwell und Weinert, 1989). Dazu zählt der START-Punkt in der G1-Phase, der den Übergang von G1 in die S-Phase kontrolliert. Vor dem Eintritt in die M-Phase sorgen das DNA-Schaden- und das S-Phase-Kontrollsystem dafür, dass DNA-Schäden repariert werden und die DNA vollständig repliziert vorliegt. Das Spindelkontrollsystem (*spindle assembly checkpoint*, SAC) überwacht die bipolare Anheftung der Chromosomen und reguliert so den Übergang von der Meta- in die Anaphase (siehe 3.3). Der Austritt aus der Mitose wird durch den Spindelorientierungskontrollpunkt von der richtig positionierten Spindel abhängig gemacht und durch zwei Signalwege, *cdc fourteen early anaphase release* (FEAR) und *mitotic exit network* (MEN), reguliert. Neben den Kontrollsystemen wird die Aktivität wichtiger Zellzyklus-Regulatoren durch phasenspezifische Expression und gezielte Proteolyse gesteuert. Dabei spielen positive und negative Rückkopplung eine wichtige Rolle. Zudem unterstützen verschiedene Zellzyklus-Regulatoren mittels posttranslationaler Modifikationen den Ablauf des Zellzyklus.

3.2.1 Regulation des Zellteilungszyklus durch die zyklinabhängige Kinase

Wichtige zellzyklusspezifische Regulatoren sind die zyklinabhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinase*, Cdk), die bis zum Menschen hoch konserviert sind. In *S. cerevisiae* sind sechs verschiedene Cdk bekannt, wobei nur die Cdk1 essentiell ist (Enserink und Kolodner, 2010). Cdk bestehen aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit, den Zyklinen, von der die Aktivität der Cdk abhängig ist. Außerdem wird die Aktivität durch die Phosphorylierung des aktiven Zentrums (in *S. cerevisiae* T169), die durch *Cdk activating kinases* (Cak) vermittelt wird, unterstützt. Neben den Aktivatoren sind auch Inhibitoren (*Cdk inhibitor*, Cki) vorhanden, die durch Bindung an die Cdk deren Aktivität negativ beeinflussen.

Cdk sind Ser/Thr-Kinasen und phosphorylieren ihre Substrate an Serin- bzw. Threoninresten der Konsensussequenz S/T-P-X-K/R, wobei häufig auch der minimale Konsensus (S/T-P) ausreicht. Die zellzyklusspezifische Fluktuation der Zykline reguliert zum einen die zeitliche Aktivität der Cdk und vermittelt zum anderen die Substratspezifität. In *S. cerevisiae* werden neun verschiedene Zykline exprimiert, die in G1- (Cln1-3), S- (Clb5 und 6) und M- (Clb1-4) Zykline unterteilt werden können. Die katalytische Untereinheit der Cdk1 wird durch das Gen *CDC28* kodiert.

In der G1-Phase ist die Aktivität der Cdk1 wegen der niedrigen Expression und der Degradation der Zykline sowie des Vorhandenseins der Cki gering. Einzige Ausnahme ist Cln3, das in der G1-Phase exprimiert wird und dadurch akkumuliert. Die Menge des Cki Far1 reicht am Ende der G1-Phase nicht mehr aus, um Cdk1-Cln3 zu inhibieren (Alberghina *et al.*, 2004). Aufgrund dessen kann Cdk1-Cln3 durch Stimulation der Transkription der beiden anderen G1-Zykline *CLN1* und *CLN2* sowie der S-Zykline *CLB5* und *CLB6* den Eintritt in den Zellzyklus einleiten (Tyers *et al.*, 1993). Somit können Cdk1-Cln1/Cln2 die Ausbildung der Knospe und die Duplikation des SPK initiieren. Außerdem stimulieren sie die Inaktivierung der Cdh1/Hct1-vermittelten Degradation der Clb-Zykline und die Degradation des Cdk1-Clb Inhibitors Sic1 (Schwob *et al.*, 1994). Dadurch sind die Aktivierung der Cdk1-Clb5/Clb6 und der Eintritt in die S-Phase möglich. Dort induzieren Cdk1-Clb5/Clb6 die DNA-Replikation (Epstein und Cross, 1992; Schwob und Nasmyth, 1993) und Cdk1-Cln durch Autophosphorylierung ihre eigene Degradation (Lanker *et al.*, 1996). Am Ende der S-Phase beginnt die Akkumulation der M-Zykline. Allerdings wird die Aktivität der Cdk1-Clb1-4 bis zum G2/M-Übergang über die inhibitorische Phosphorylierung des Tyrosinrests Y19 durch Swe1 reguliert (Booher *et al.*, 1993). Diese Phosphorylierung wird durch die Phosphatase Mih1 und die Degradation von Swe1 wieder rückgängig gemacht (Russell *et al.*, 1989). Daran ist die Cdk1 selbst beteiligt, wodurch eine positive Rückkopplung entsteht und einen schnellen Anstieg an aktiven Cdk1-Clb1-4 sowie den Eintritt in die M-Phase zur Folge hat. In der M-Phase sorgen Cdk1-Clb1-4 für den Wechsel von apikalem zu isotropem Wachstum der Knospe, die Ausbildung und Elongation der Spindel sowie die Trennung der Chromosomen und den damit verbundenen Übergang von Meta- zur Anaphase (Surana *et al.*, 1991; Richardson *et al.*, 1992; Lew und Reed, 1993). Der Austritt aus der Mitose wird durch die Degradation der M-Zykline und der Expression des Cdk1-Clb Inhibitors Sic1 ermöglicht. Dazu wird die Phosphatase Cdc14 aktiviert (siehe 3.2.3). Als Gegenspieler der Cdk1 dephosphoryliert Cdc14 deren Substrate (Visintin *et al.*, 1998). Somit ist wieder eine G1-Phase mit niedriger Cdk-Aktivität und hypophosphorylierten Substraten gewährleistet. Neben

der Expression von Sic1 wird in der G1-Phase der Cdk1-Cln Inhibitor Far1 exprimiert, der vor allem den Eintritt in den Zellzyklus bei der Paarung verhindert (Peter und Herskowitz, 1994).

3.2.2 Regulation des Zellteilungszyklus durch Ubiquitin-vermittelte Proteindegradation

Die Proteolyse der Zykline und damit die Inaktivierung der Cdk ist eine Voraussetzung für den Austritt aus der Mitose. Die Inaktivierung der Cdk wird zusätzlich durch die Cki unterstützt, deren Degradation wiederum eine Voraussetzung für den Eintritt in die Mitose ist. Neben der Kontrolle der Aktivität der Cdk spielt der Proteinabbau beim Übergang von der Meta- in die Anaphase eine wichtige Rolle. Die zielgerichtete Proteolyse von Zellzyklus-Regulatoren macht den Ablauf des Zellteilungszyklus irreversibel und unidirektional, da die Degradation eines Proteins immer eine Neusynthese erfordert. So stellt die Proteindegradation einen weiteren essentiellen Kontrollmechanismus des Zellzyklus dar.

Bei der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse werden die zu degradierenden Proteine mit Ubiquitin-Ketten markiert (Ubiquitinierung) und anschließend durch das 26S Proteasom abgebaut (Hershko und Ciechanover, 1998; Miller und Gordon, 2005; Finley *et al.*, 2012). Ubiquitin ist hoch konserviert und besteht aus 76 Aminosäuren. Die Ubiquitinierung erfolgt durch eine Enzymkaskade, die aus drei Schritten besteht. Zuerst wird Ubiquitin unter Hydrolyse von ATP über sein C-terminales Glycin kovalent an einen Cysteinrest des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1 gebunden. Als nächstes wird dann das aktivierte Ubiquitin auf einen Cysteinrest des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 übertragen. Zuletzt erfolgt der Transfer von Ubiquitin auf das Zielprotein, der durch eine Ubiquitin-Ligase E3 katalysiert wird. Dabei wird Ubiquitin mit dem Zielprotein über eine Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und einer Lysinseitenkette des Substrats verknüpft. Durch Isopeptidbindungen zwischen mehreren Ubiquitinmolekülen am Lysinrest K48 können Polyubiquitinketten entstehen, die zur Erkennung der Zielproteine durch das 26S Proteasom notwendig sind (Weissman, 2001). Die Erkennung des markierten Proteins erfolgt durch die regulatorische 19S-Untereinheit des Proteasoms und der eigentliche Abbau zu kurzen Peptiden durch die katalytische 20S-Untereinheit.

Bei der Ubiquitinierung sind die Ubiquitin-Ligasen für die Substratspezifität verantwortlich. Dabei sind für das Fortschreiten des Zellzyklus zwei Ubiquitin-Ligasen essentiell, der SCF-Komplex, der nach seinen Untereinheiten Skp1/Cullin/F-Box-Protein benannt ist und der anaphase promoting complex (APC) (Peters, 1998). Beide E3-Enzyme sind

Multiproteinkomplexe und gehören der Familie der RING-Finger-Ubiquitin-Ligasen an. Der namensgebende RING-Finger enthält eine Zink bindende Domäne, die das mit Ubiquitin konjugierte E2-Enzym bindet (Deshaies und Joazeiro, 2009). Außerdem haben diese Ubiquitin-Ligasen eine weitere Untereinheit gemeinsam, ein Mitglied der Cullin-Familie, das häufig als Gerüstprotein dient und die RING-Finger-Komponente mit dem restlichen Komplex verbindet. Anders als bei HECT-Ubiquitin-Ligasen findet keine direkte Bindung des Ubiquitins statt, sondern RING-Finger-Ubiquitin-Ligasen vermitteln durch eine optimale Positionierung des E2-Ubiquitin-Konjugats und des Substrats den Ubiquitintransfer auf das Zielprotein (Weissman, 2001; Matyskiela *et al.*, 2009). Der SCF-Komplex und der APC unterscheiden sich zum einen durch die unterschiedliche Substraterkennung und zum anderen durch die unterschiedliche Regulation der Enzymaktivität, wodurch sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten aktiv sind. Durch dieses fein regulierte Zusammenspiel der beiden Ubiquitin-Ligasen sind der G1/S-Übergang (SCF), der Übergang von der Meta- zur Anaphase sowie der Austritt aus der Mitose (beides APC) durch Proteolyse reguliert.

3.2.2.1 Der SCF-Komplex

Durch die Ubiquitin-vermittelte Degradation reguliert der SCF-Komplex den Übergang von G1 in die S-Phase. Der SCF-Komplex in *S. cerevisiae* besteht aus den Untereinheiten Skp1, Cdc53 und Rbx1/Hrt1 (Feldman *et al.*, 1997; Kamura *et al.*, 1999). Dabei entspricht Cdc53 der Cullin-Gerüstuntereinheit und Rbx1/Hrt1 dem charakteristischen RING-Finger. Die Komponente Skp1 bindet einerseits an Cdc53 und ist andererseits an der Substratbindung beteiligt. Für die Substratbindung sind so genannte F-Box-Proteine zuständig, wie Cdc4 und Grr1, die wiederum an Skp1 binden (Skowyra *et al.*, 1997). Die Ubiquitinierung der SCF-Substrate wird nicht durch die enzymatische Aktivität des SCF reguliert, die während des Zellzyklus konstant ist, sondern durch die Bindung der Substrate. F-Box-Proteine binden gezielt Proteine, die vorher an einer oder mehreren spezifischen Positionen phosphoryliert wurden (Gartner *et al.*, 1998; Nash *et al.*, 2001).

Beim G1/S-Übergang hat der SCF-Komplex zwei wichtige Funktionen. Zum einen sorgt der SCF mit seinem F-Box-Protein Cdc4 (SCF^{Cdc4}) für die Degradation der beiden Cki Sic1 und Far1, die vorher durch Cdk1-Cln phosphoryliert wurden. Dadurch kann der Eintritt in die S-Phase und die Aktivierung der Cdk1-Clb5/Clb6 initiiert werden (siehe Kapitel 3.2.1). Zum anderen ist der SCF^{Grr1} zu Beginn der S-Phase für die Ubiquitinierung der G1-Zykline Cln1-3 zuständig, die durch Autophosphorylierung ihre eigene Degradation stimulieren (Lanker *et al.*, 1996).

3.2.2.2 *Anaphase promoting complex (APC)*

Der APC vermittelt die Proteindegradation während der Mitose und in der G1-Phase. Im Gegensatz zum SCF-Komplex ist die Struktur des APC deutlich komplexer. In *S. cerevisiae* besteht der APC aus 13 Untereinheiten, die in einer asymmetrischen dreieckigen Gesamtstruktur mit einem inneren Hohlraum angeordnet sind (Thornton *et al.*, 2006; Matyskiela *et al.*, 2009; Pines, 2011). Der Gesamtkomplex lässt sich in zwei Subkomplexe unterteilen, den katalytischen und den TPR-Arm, die über das Gerüstprotein Apc1 miteinander verbunden sind. Der katalytische Arm enthält die Cullin-Untereinheit Apc2 und die RING-Finger-Untereinheit Apc11, die zur Bindung des Ubiquitin-beladenen E2-Enzyms nötig ist. Außerdem enthält der Subkomplex noch eine weitere Komponente, Doc1, die an der Bindung von Substraten beteiligt ist (Buschhorn *et al.*, 2011). Der TPR-Arm besteht aus den Untereinheiten Cdc23, Cdc16 und Cdc27, die in bis zu drei Kopien im Komplex vorliegen (Passmore *et al.*, 2005). Diese Komponenten weisen charakteristische Wiederholungen einer Domäne auf, die zur Wechselwirkung mit anderen Proteinen dient, die *tetratricopeptide repeats* (TPR). So bindet Cdc27 an Cdc16, Cdc16 an Cdc23 (Thornton *et al.*, 2006) und Cdc23 wiederum an kleine Adapterproteine, Apc4 und Apc5, die den TPR-Arm mit Apc1 verbinden. Weitere Untereinheiten sind Apc9, Mnd2, Cdc26 und Apc13/Swm1, die nicht essentiell sind und deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Cdc26 und Apc13/Swm1 tragen vermutlich zur Stabilisierung der APC-Struktur bei und Mnd2 spielt möglicherweise eine Rolle bei der Inaktivierung des Spindelkontrollsystems (Matyskiela *et al.*, 2009; Foster und Morgan, 2012).

Die Substratspezifität und die Aktivität des APC werden durch die hoch konservierten Co-Aktivatoren Cdc20 und Hct1 vermittelt, die über den TPR-Arm und Apc2 an den APC binden. Zur Bindung an den APC besitzen sie zwei Domänen, die C-Box und das IR-Motif, und für die Substratbindung ist deren C-terminale WD40-Domäne verantwortlich (Schwab *et al.*, 2001; Vodermaier *et al.*, 2003; Kraft *et al.*, 2005). Cdc20 und Hct1 aktivieren den APC zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Mitose, wodurch eine geordnete Degradation der APC-Substrate sichergestellt wird. Zusätzlich gibt es in *S. cerevisiae* einen meiosespezifischen Co-Aktivator, Amal (Cooper *et al.*, 2000). Die Substraterkennung erfolgt über spezifische Degradationssignale in den Substraten, sogenannte Degrons. Am häufigsten kommen die *destruction box* (D-Box) mit der Konsensussequenz R-X-X-L(X)₄-N (Glotzer *et al.*, 1991) und die KEN-Box, die aus K-E-N(X)₃-E/D/N besteht, vor (Pfleger und Kirschner, 2000). Sowohl Cdc20- als auch Hct1-Substrate können beide Signale enthalten, wobei häufig mehrere Degrons bzw. Kombinationen aus D- und KEN-Box vorkommen. Neueste

Untersuchungen zeigen, dass Substrate über die D-Box wahrscheinlich nicht nur an den Co-Aktivator, sondern auch direkt an den APC binden. Es wird vermutet, dass Doc1 und Hct1 einen Co-Rezeptor für die Bindung der D-Box ausbilden (Buschhorn *et al.*, 2011; da Fonseca *et al.*, 2011). Dadurch werden vermutlich die Bindung und die Ubiquitinierung der Substrate effektiver und auch die Interaktionen zwischen APC, Co-Aktivator und Substrat robuster (Matyskiela *et al.*, 2009).

Die Bindung der beiden Co-Aktivatoren an den APC und damit die Aktivität des APC werden in der Mitose durch mehrere Mechanismen reguliert. Vom Beginn der Mitose bis zur Anaphase ist der APC in Verbindung mit Cdc20 ($\text{APC}^{\text{Cdc20}}$) aktiv, wodurch die Trennung der Schwesterchromatiden und der Austritt aus der Mitose eingeleitet werden. Danach sorgt der APC^{Hct1} für den Abschluss der Mitose und die Aufrechterhaltung der G1-Phase.

In der frühen M-Phase wird der APC durch Cdk1-Clb phosphoryliert, was die Bindung von Cdc20 an den APC fördert (Rudner und Murray, 2000). Außerdem wird die $\text{APC}^{\text{Cdc20}}$ -Aktivität durch das Spindelkontrollsystem reguliert, wodurch sicher gestellt wird, dass alle Chromosomen bipolar mit Mikrotubuli verbunden sind, bevor deren Trennung beginnt (siehe 3.3). Zusätzlich wird die Aktivität des $\text{APC}^{\text{Cdc20}}$ durch Fluktuation von Cdc20 während des Zellteilungszyklus reguliert. Cdc20 wird zellzyklusspezifisch exprimiert und am Ende der Mitose APC^{Hct1} -abhängig abgebaut (Shirayama *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu Cdc20 ist der Proteinlevel von Hct1 konstant. Allerdings wird die Interaktion von Hct1 mit dem APC in der frühen Mitose durch Phosphorylierung von Hct1 verhindert. Von Beginn der S-Phase bis zur späten Mitose wird Hct1 Cdk1-Cln1/Cln2 und Cdk1-Clb5 abhängig phosphoryliert und dadurch aus dem Kern ins Zytoplasma exportiert (Zachariae *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1999; Jaquenoud *et al.*, 2002). Erst zum Ende der Mitose, wenn die Phosphatase Cdc14 aktiv ist und die Cdk1-Aktivität sinkt, wird Hct1 dephosphoryliert, wodurch Hct1 in den Kern transportiert wird und somit den APC aktivieren kann. Die Aktivität von APC^{Hct1} wird zusätzlich durch Acn1, einem Pseudo-Substrat-Inhibitor, kontrolliert (Martinez *et al.*, 2006; Burton *et al.*, 2011).

Für das Fortschreiten des Zellzyklus ist die Degradation der beiden $\text{APC}^{\text{Cdc20}}$ -Substrate Securin Pds1 und Clb5 essentiell (Thornton und Toczyski, 2003; Peters, 2006; Sullivan und Morgan, 2007). Die Degradation von Pds1 hat die Aktivierung der Separase Esp1 zur Folge, die dadurch die Kohäsion-Untereinheit Scc1 spalten kann und somit die Trennung der Schwesterchromatiden ermöglicht. Die Degradation von Clb5 ist notwendig für den Austritt aus der Mitose, da dadurch die Cdk1-Aktivität abnimmt (Shirayama *et al.*, 1999). Die Cdk1-Aktivität wird zusätzlich durch die beginnende $\text{APC}^{\text{Cdc20}}$ -abhängige Clb2 Degradation

reduziert (Yeong *et al.*, 2000; Wäsch und Cross, 2002). Der APC^{Hct1}-Inhibitor Acml ist vermutlich ein weiteres Substrat des APC^{Cdc20} (Enquist-Newman *et al.*, 2008). Durch dessen Degradation und durch die reduzierte Cdk1-Aktivität kann Hct1 mit dem APC interagieren. Somit fördert Cdc20 seine eigene Degradation. Im Gegensatz zu Cdc20 ist die Substratspezifität von Hct1 deutlich breiter.

Zu den APC^{Hct1}-Substraten zählen neben Cdc20 beispielsweise Clb2, die Polo-Kinase Cdc5 und die Spindelproteine Ase1 und Fin1 (Juang *et al.*, 1997; Schwab *et al.*, 1997; Shirayama *et al.*, 1998; Peters, 2006; Woodbury und Morgan, 2007). Somit sorgt der APC^{Hct1} unter anderem dafür, dass die Aktivität der Cdk1 weiter reduziert, die Depolymerisation der Spindel initiiert und somit der Austritt aus der Mitose ermöglicht wird. Durch die Hct1-vermittelte Degradation der Zyklone wird zusätzlich die folgende G1-Phase aufrechterhalten. Allerdings unterliegen Hct1-Substrate meist weiteren Regulationsmechanismen, da *HCT1* im Gegensatz zu *CDC20* nicht essentiell ist. Beispielsweise wird die Aktivität der Cdk1-Clb auch durch die Bindung des Cki Sic1 gehemmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Austritt aus der Mitose durch Cdc20 initiiert und von Hct1 vollendet wird.

3.2.3 Regulation des Austritts aus der Mitose

Für den Austritt aus der Mitose ist eine geringe Aktivität der Cdk1 notwendig. Diese Voraussetzung wird einerseits durch die Degradation der Zyklone und andererseits durch die Stabilisierung und Expression von Sic1 ermöglicht. Hierfür muss die Ser-/Thr-Phosphatase Cdc14 aktiviert werden. Zum einen dephosphoryliert Cdc14 den APC-Co-Aktivator Hct1, der dadurch den APC aktivieren und die Degradation der Clb-Zyklone vermitteln kann (Schwab *et al.*, 1997; Jaspersen *et al.*, 1999) und zum anderen dephosphoryliert Cdc14 den Cdk1-Clb Inhibitor Sic1 und dessen Transkriptionsfaktor Swi5, wodurch Sic1 stabilisiert wird und akkumulieren kann (Visintin *et al.*, 1998). Somit ist Cdc14 der Gegenspieler der Cdk1.

Während der G1-, S- und frühen M-Phase wird Cdc14 im Nukleolus verankert und damit inaktiv gehalten (Shou *et al.*, 1999; Visintin *et al.*, 1999). Mit Hilfe von zwei unabhängigen Signalwegen, FEAR und MEN, wird Cdc14 in der Anaphase durch Freisetzung in den Zellkern und das Zytoplasma aktiviert (Abb. 3.2). Die Dephosphorylierung von Cdk1-Substraten durch Cdc14 und die geringe Cdk1-Aktivität ermöglichen den Austritt aus der Mitose.

3.2.3.1 Der Nukleolus – Ort der Cdc14-Inaktivierung

Der Nukleolus ist eine Substruktur des Zellkerns, der eine halbmondförmige Struktur bildet und in dem die rRNA-Synthese sowie die Assemblierung der prä-ribosomalen Untereinheiten stattfindet (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000; Tschochner und Hurt, 2003). Außerdem dient der Nukleolus als Kompartiment zur Inaktivierung der Phosphatase Cdc14 und spielt somit eine Rolle beim Austritt aus der Mitose. Die rRNA-Gene (rDNA) sind auf dem rechten Arm des Chromosoms XII in 150 – 200 Tandem-Wiederholungen lokalisiert und werden RNA Polymerase I (Pol I)-abhängig transkribiert. Anders als bei höheren Eukaryoten bleibt die Struktur des Nukleolus während der Mitose intakt und wird entlang der Spindel getrennt (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000). Die Trennung der rDNA ist gegenüber der Trennung der Chromosomen verzögert, da dafür durch FEAR freigesetztes Cdc14 nötig ist (D'Amours *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2004). Die Verankerung von Cdc14 im Nukleolus wird durch dessen nukleolären Inhibitor Net1, der Hauptkomponente des RENT-Komplexes (*regulator of nucleolar silencing and telophase*), gewährleistet. Der RENT-Komplex besteht aus Net1, Cdc14 sowie Sir2 und ist für rDNA *silencing* zuständig (Straight *et al.*, 1999). Außerdem ist Net1 eine wichtige Strukturkomponente des Nukleolus, da Net1 für die Nukleolus-Lokalisation von Proteinen notwendig ist, wie Nop1 und Nop56, die für die Ribosomenbiogenese zuständig sind (Gautier *et al.*, 1997; Shou *et al.*, 2001). Hmo1, ein *high mobility group* (HMG)-Protein, ist eine weitere Strukturkomponente des Nukleolus. Hmo1 bindet an die rDNA und unterstützt die RNA Pol I (Gadal *et al.*, 2002; Merz *et al.*, 2008). Der RENT-Komplex wird über Fob1 an die rDNA gebunden und die Interaktion von Fob1 mit Net1 stabilisiert die Bindung von Net1 an Cdc14 (Huang und Moazed, 2003; Stegmeier *et al.*, 2004). Neben der Verankerung von Cdc14 im Nukleolus trägt die Bindung an Net1 auch zur Inaktivierung von Cdc14 bei (Traverso *et al.*, 2001). Die Affinität von Net1 gegenüber Cdc14 wird durch Phosphorylierung von Net1 verringert. Net1 wird Cdk1- und Cdc5-abhängig phosphoryliert, wobei eher die Cdk1-abhängige Phosphorylierung für die Freisetzung von Cdc14 entscheidend ist (Shou *et al.*, 2002; Yoshida und Toh-e, 2002; Visintin *et al.*, 2003; Azzam *et al.*, 2004).

3.2.3.2 Cdc14-Aktivierung durch FEAR und MEN

Der FEAR-Signalweg besteht aus der Separase Esp1, deren Substrat und Kinetochorprotein Slk19, den nukleolären Proteinen Spo12 und Fob1, der Protein-Phosphatase PP2A^{Cdc55}, der Polo-Kinase Cdc5 und Cdk1-Clb1/2 (Stegmeier *et al.*, 2002; Rock und Amon, 2009). Obwohl

die molekularen Details des Signalwegs noch immer nicht vollständig verstanden sind, ist das Zusammenspiel der Komponenten geklärt (Abb. 3.2).

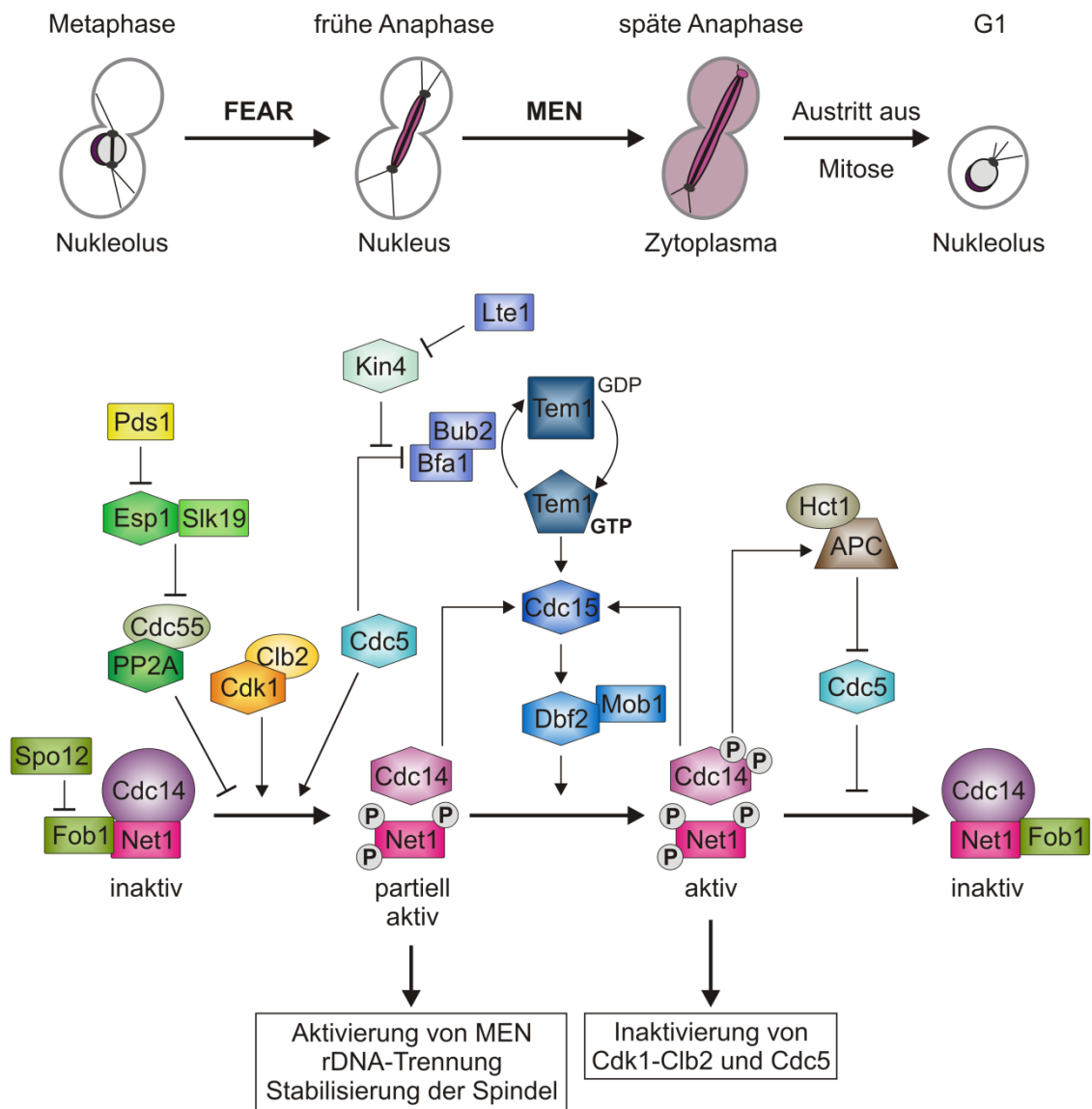


Abbildung 3.2 Regulation der Phosphatase Cdc14 und des Austritts aus der Mitose [verändert nach (Sullivan und Morgan, 2007; De Wulf *et al.*, 2009; Rock und Amon, 2009; Caydasi und Pereira, 2012)]

Cdc14 (violett) lokalisiert von der G1-Phase bis zum Übergang in die Anaphase im Nukleolus. Durch den FEAR-Signalweg (grün) wird Cdc14 zunächst in den Zellkern freigesetzt und dephosphoryliert dort verschiedene Substrate, die für den weiteren Ablauf der Anaphase sorgen. In der späten Anaphase erfolgt die vollständige Freisetzung durch die MEN-Signalkaskade (blau) in den Kern und ins Zytoplasma, wodurch der Austritt aus der Mitose möglich ist. Durch Inaktivierung von Cdc5 in der G1-Phase kehrt Cdc14 in den Nukleolus zurück. (Für Details siehe Text; Stimulierung wurde durch einen Pfeil dargestellt, Inhibierung durch einen Balken)

Zu Beginn der Anaphase wird die Separase durch die Degradation von Securin aktiviert. Dadurch werden zum einen die Trennung der Schwesterchromatiden und zum anderen die Interaktion von Esp1 mit Slk19 möglich. Der Esp1-Slk19-Komplex inaktiviert die PP2A^{Cdc55}, die der Phosphorylierung von Net1 entgegen wirkt und so eine verfrühte Freisetzung von Cdc14 verhindert (Queralt *et al.*, 2006; Calabria *et al.*, 2012). Durch die Verringerung der PP2A^{Cdc55}-Aktivität kann Net1 von Cdk1-Clb2 phosphoryliert werden. Außerdem wird Spo12 Cdk1-Clb2-abhängig phosphoryliert, wodurch Fob1 inhibiert und dadurch zusätzlich die Interaktion von Net1 und Cdc14 verringert wird (Stegmeier *et al.*, 2004; Tomson *et al.*, 2009). Die Phosphorylierung von Net1 wird durch Cdc5 unterstützt (Visintin *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2009). Die verringerte Affinität von Net1 gegenüber Cdc14 führt dazu, dass Cdc14 transient in den Nukleus freigesetzt wird (Abb. 3.2). Aufgrund der dualen Funktion der Separase wird sichergestellt, dass der Beginn der Cdc14-Freisetzung erst stattfindet, wenn die Trennung der Schwesterchromatiden initiiert wurde. Außerdem werden die Trennung der Chromosomen und die Cdc14-Freisetzung durch positive Rückkopplung verstärkt (Holt *et al.*, 2008). Durch FEAR aktiviertes Cdc14 ist nötig für die Trennung der rDNA, die Dynamik und die Stabilisierung der Spindel sowie die Bildung der *spindle midzone*, eine Region in der sich die interpolaren Mikrotubuli überlappen und die Positionierung des Zellkerns (Rock und Amon, 2009). Allerdings benötigt die vollständige Freisetzung von Cdc14 den MEN-Signalweg, ohne den die Freisetzung von Cdc14 nicht aufrechterhalten werden kann. Eine weitere Funktion des durch FEAR freigesetzten Cdc14 ist, seine eigene Freisetzung zu stimulieren, indem es die MEN-Aktivität unterstützt.

An oberster Stelle des MEN-Signalwegs steht die kleine Ras-ähnliche GTPase Tem1 (Jaspersen *et al.*, 1998; Segal, 2011). Die Aktivität von Tem1 wird durch den positiven Regulator Lte1 und dem negativen *GTPase activating protein* (GAP)-Komplex Bfa1-Bub2 reguliert. Cdc5 ist sowohl eine Komponente des FEAR- als auch des MEN-Signalwegs und inhibiert durch Phosphorylierung von Bfa1 den Bfa1-Bub2-Komplex (Hu *et al.*, 2001; Geymonat *et al.*, 2003). Dagegen schützt die Phosphorylierung von Bfa1 durch die Kinase Kin4 Bfa1-Bub2 vor der inhibitorischen Wirkung von Cdc5 (D'Aquino *et al.*, 2005; Pereira und Schiebel, 2005). Kin4 ist eine Komponente des Spindelorientierungskontrollsystems, der, wenn die Spindel fehlpositioniert ist, den Austritt aus der Mitose inhibiert, um eine fehlerhafte Trennung der Chromosomen zu verhindern. Anders als zunächst vermutet, wird die positive Wirkung von Lte1 auf Tem1 nicht durch eine *Guanine nucleotide exchange factor* (GEF)-Funktion vermittelt, sondern durch Inhibition von Kin4 (Abb. 3.2; Geymonat *et al.*, 2009; Bertazzi *et al.*, 2011; Falk *et al.*, 2011; Caydasi und Pereira, 2012). Dabei spielt die

Lokalisation von Kin4 und den MEN-Komponenten eine entscheidende Rolle. Kin4 lokalisiert hauptsächlich am Kortex und teilweise am SPK der Mutterzelle, dagegen lokalisiert Lte1 am Kortex der Knospe, Cdc5 an beiden SPK und Tem1 sowie Bfa1-Bub2 bevorzugt am SPK, der in die Knospe (dSPK) transportiert wird (Pereira *et al.*, 2000; Maekawa *et al.*, 2007; Monje-Casas und Amon, 2009). Die Lokalisation von Kin4 am dSPK wird durch Lte1 verhindert, wodurch Bfa1-Bub2 durch Cdc5 inhibiert und somit Tem1 aktiviert werden kann. Wie Tem1 und damit MEN genau aktiviert werden, ist jedoch nicht vollständig klar. Es wäre denkbar, dass für die Aktivierung von Tem1 ein GEF verzichtbar ist, da Tem1 selbst eine hohe intrinsische Austauschrate von GDP zu GTP hat (Geymonat *et al.*, 2002) und somit die Inhibierung des GAPs für seine Aktivierung ausreichen würde (Caydasi und Pereira, 2012). Die SPK-Komponente Nud1 dient als Gerüstprotein zur Bindung von Tem1, Bfa1-Bub2, Cdc5 und den weiteren MEN-Komponenten Cdc15 und Dbf2-Mob1 an den SPK (Gruneberg *et al.*, 2000; Valerio-Santiago und Monje-Casas, 2011). Die Lokalisation von Tem1 am SPK und wahrscheinlich auch die von Cdc15 und Dbf2-Mob1 sind für die Aktivität von MEN essentiell (Valerio-Santiago und Monje-Casas, 2011). Aktives Tem1 (Tem1-GTP) rekrutiert und aktiviert Cdc15, das wiederum Dbf2-Mob1 rekrutiert und durch Phosphorylierung der Kinase-Untereinheit Dbf2 aktiviert (Abb. 3.2; Lee *et al.*, 2001; Mah *et al.*, 2001; Bosl und Li, 2005). Letztlich wird Cdc14 von Dbf2-Mob1 an der Kernlokalisationssequenz (NLS) phosphoryliert, wodurch Cdc14 ins Zytoplasma transportiert wird und dort akkumuliert (Bembenek *et al.*, 2005; Mohl *et al.*, 2009).

Neueste Studien zeigen, dass parallel zu Tem1 auch Cdc5 für die Rekrutierung von Cdc15 an den SPK nötig ist (Rock und Amon, 2011). Die ausschließliche Aktivität von MEN am dSPK wird neben Kin4 zusätzlich durch die Cdk1 gewährt, die Cdc15 und Mob1 am Mutter-SPK phosphoryliert und damit inhibiert (König *et al.*, 2010). Cdc14 unterstützt dagegen durch Dephosphorylierung von Cdc15 und Mob1 deren Rekrutierung zum dSPK (Jaspersen und Morgan, 2000; König *et al.*, 2010). Somit stimuliert Cdc14 durch positive Rückkopplung seine eigene Aktivität.

Auch die eigene Rückkehr in den Nukleolus wird durch Cdc14 selbst induziert. In der späten Anaphase dephosphoryliert Cdc14 den APC-Co-Aktivator Hct1, wodurch dieser mit dem APC interagiert und die Degradation von Cdc5 vermitteln kann. Da Cdc5 ein Regulator der beiden Signalwege und essentiell für die Cdc14-Freisetzung ist, führt der Abbau von Cdc5 zur Rückkehr von Cdc14 in den Nukleolus (Visintin *et al.*, 2008). Zusätzlich trägt Cdc14 durch Dephosphorylierung von Bfa1 zur Inaktivierung von MEN bei (Pereira *et al.*, 2002). Die Hauptaufgabe von Cdc14 in der späten Anaphase ist die Verringerung der Cdk1-Aktivität und

die Dephosphorylierung der Cdk1-Substrate, um eine stabile G1-Phase zu gewährleisten. Um die Cdk1-Aktivität zu verringern, dephosphoryliert Cdc14 neben Hct1 Sic1 und dessen Transkriptionsfaktor Swi5. Dadurch wird zum einen die APC^{Hct1}-abhängige Degradation der Zyklone vermittelt und zum anderen der Cdk1-Inhibitor Sic1 stabilisiert, der durch die Dephosphorylierung vor der SCF-abhängigen Degradation geschützt ist (Schwob *et al.*, 1994; Nash *et al.*, 2001). Zusätzlich wird durch die Dephosphorylierung von Swi5 dessen NLS zugänglich, wodurch Swi5 in den Kern transportiert und die *SIC1*-Transkription aktiviert wird (Moll *et al.*, 1991).

Da einige Komponenten des MEN-Signalwegs, wie Cdc5, Dbf2-Mob1 und auch Cdc14, an der Zytokinese beteiligt sind, ist die Zytokinese an die Aktivität von MEN gekoppelt. Dadurch wird sichergestellt, dass die Trennung von Mutter- und Tochterzelle erst initiiert wird, wenn der Austritt aus der Mitose eingeleitet ist (Rauter und Barral, 2006; Meitinger *et al.*, 2012).

3.3 Das Spindelkontrollsystem

Das Spindelkontrollsystem inhibiert den Übergang von der Metaphase zur Anaphase so lange, bis alle Chromosomen bipolar mit der Spindel über Mikrotubuli verbunden sind, um eine fehlerhafte Trennung zu verhindern (Musacchio und Salmon, 2007; Kim und Yu, 2011). Anfang der 1990er Jahre wurden in *S. cerevisiae* mittels genetischer Studien die Hauptkomponenten des SAC entdeckt, deren Mutationen in Gegenwart von Spindelgiften nicht zu einem Metaphase-Arrest führten. Dazu zählen zum einen die *mitotic arrest deficient* (MAD)-Gene *MAD1*, *MAD2* und *MAD3* und zum anderen die *budding uninhibited by benzimidazole* (BUB)-Gene *BUB1* und *BUB3*, die in allen Eukaryoten hoch konserviert sind (Musacchio und Salmon, 2007). Zu Beginn der Metaphase wird der APC^{Cdc20}, der den Metaphase-Anaphase-Übergang induziert, durch das SAC in Form des *mitotic checkpoint complex* (MCC) inhibiert. Der MCC besteht aus den Komponenten Mad2, Mad3, Bub3 und Cdc20 selbst. Weitere SAC-Komponenten sind Mad1, Bub1, Mps1 und die Aurora B Kinase Ipl1, die an der Detektion der fehlerhaften Spindelanheftung und an der Bildung des MCC beteiligt sind. Zur Aktivierung des SAC werden die Komponenten ans Kinetochor rekrutiert.

3.3.1 Kinetochorstruktur und Aktivierung des SAC

Neben der Spindelanheftung an die Chromosomen, dienen die Kinetochore als Bindestelle für die Hauptkomponenten des Spindelkontrollsystems. Bei Vertebraten sind die Kinetochore nur

während der Mitose sichtbar, dagegen sind die Kinetochore in *S. cerevisiae* während des gesamten Zellteilungszyklus zu erkennen. Nur während der S-Phase, wenn die Zentromer-DNA repliziert wird, wird die Struktur der Kinetochore kurzfristig aufgelöst (Tanaka *et al.*, 2005). Bis zur M-Phase lokalisieren die Kinetochore in der Nähe der SPK und lagern sich dabei zusammen (Jin *et al.*, 2000; Janke *et al.*, 2001). In der M-Phase kommt es zur bipolaren Anheftung der Kinetochore durch die Mikrotubuli, wobei in Hefe jedes Kinetochor mit einem einzelnen Mikrotubulus verbunden wird. Bei der Trennung der Schwesterchromatiden werden die Kinetochore mit Hilfe von Motorproteinen entlang der Mikrotubuli zum SPK transportiert.

Die Struktur des Kinetochors kann in mehrere Subkomplexe unterteilt werden. Der Cbf3-Komplex bindet die Nukleosomen der Zentromer-Region, die ein zentromerspezifisches Histon H3 (Cse4) beinhalten (Stoler *et al.*, 1995; Meluh *et al.*, 1998). Die Komplexe Ctf19, Mtw1, Spc105 und Ndc80 binden über Mif2 an den Cbf3-Komplex. Der Ndc80- und der Dam1-Komplex stellen die Mikrotubuli-Bindestelle dar. Viele Komponenten dieser Komplexe sind bis zu den Vertebraten konserviert (Tanaka *et al.*, 2005; Santaguida und Musacchio, 2009; Cho *et al.*, 2010). Außerdem lokalisiert an den Kinetochoren der *chromosomal passenger complex* (CPC), der die Aurora B Kinase Ipl1 und dessen Aktivator Sli15 beinhaltet und für die bipolare Anheftung der Mikrotubuli wichtig ist.

Das Spindelkontrollsystem wird durch fehlerhafte Anheftung der Mikrotubuli aktiviert. Entweder durch unbesetzte Kinetochore (monotelische Verknüpfung) oder durch den Verlust der Spannung zwischen den Schwesterkinetochoren, der durch die Anheftung der Schwesterkinetochore mit Mikrotubuli vom selben SPK ausgehend (syntelische Verknüpfung) ausgelöst wird. Diese Spannungsverluste werden vermutlich durch Ipl1, das eine Korrektur der fehlerhaften Anheftung induziert, detektiert. Dabei phosphoryliert Ipl1 Untereinheiten der Mikrotubuli-Bindestelle, wodurch die Verbindung zwischen den Mikrotubuli und den Kinetochoren destabilisiert wird (Tanaka *et al.*, 2005; Pinsky *et al.*, 2006; Musacchio und Salmon, 2007). So entstehen wieder unbesetzte Kinetochore und der SAC wird aktiviert. Unbesetzte Kinetochore werden auch durch die Anwesenheit von Spindelgiften wie z. B. Nocodazol erzeugt, die zur Depolymerisation der Mikrotubuli führen. Durch die Überexpression von Mps1, einem wichtigen Regulator des SAC, kann das Spindelkontrollsystem auch unabhängig von unbesetzten Kinetochoren aktiviert werden (Hardwick *et al.*, 1996). Die Aktivierung des SAC hat zur Folge, dass die SAC-Komponenten ans Kinetochor rekrutiert werden und der MCC gebildet wird.

3.3.2 Bildung des MCC und APC-Inhibierung

Der MCC ist der Effektor des SAC und besteht aus den Komponenten Mad2, Mad3, Bub3 und Cdc20, wobei Mad2 und Mad3 direkt an Cdc20 binden (Musacchio und Salmon, 2007; Kim und Yu, 2011; Chao *et al.*, 2012). Die Bildung des MCC wird durch unbesetzte Kinetochore und die Rekrutierung eines Komplexes aus Mad1-Mad2 induziert. Mad2 kann in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen, der *open* (oMad2)- und der *closed* (cMad2)-Konformation. Durch die Bindung an Mad1 entsteht die Konformationsänderung von oMad2 zu cMad2 und es bildet sich ein stabiler Mad1-cMad2-Komplex, der während des Zellzyklus am Kernporenkomplex lokalisiert (Iouk *et al.*, 2002). Der genaue Mechanismus der MCC-Bildung ist bis jetzt noch nicht vollständig verstanden, aber das *Mad2-template* Modell (De Antoni *et al.*, 2005) wird als sehr wahrscheinlich angesehen (Abb. 3.3).

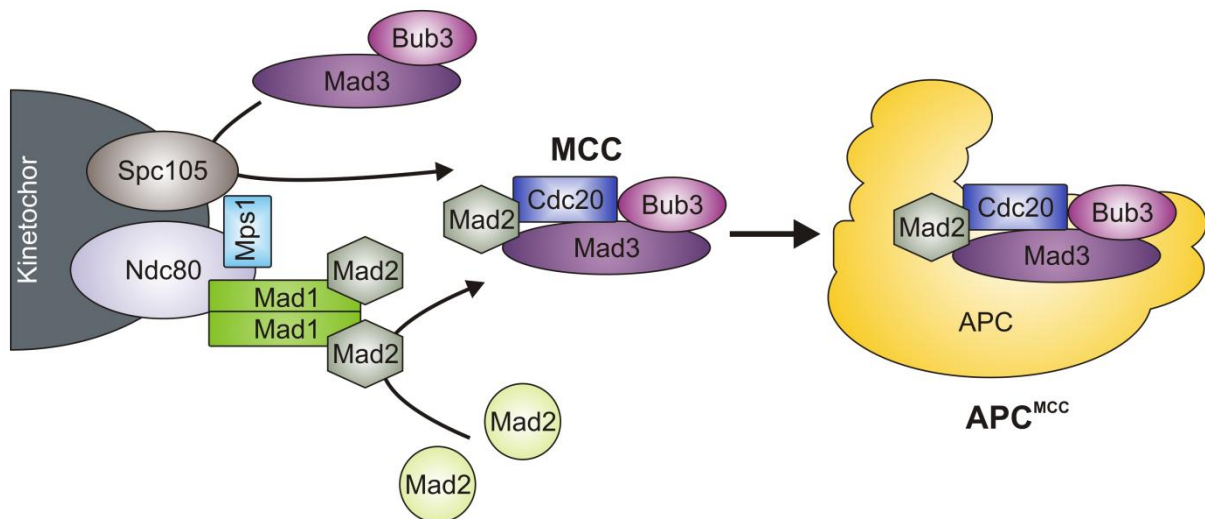


Abbildung 3.3 MCC-Bildung und APC^{Cdc20}-Inhibierung an unbesetzten Kinetochoren [verändert nach (Zich und Hardwick, 2009; Kim und Yu, 2011; Pines, 2011)]

Der Mad1-cMad2-Komplex rekrutiert oMad2 (hellgrün), wodurch die Konformationsänderung zu cMad2 (grau) und die Bindung an Cdc20 erfolgt. Zusammen mit Mad3 und Bub3 bilden Cdc20-cMad2 den MCC, der an den APC bindet und ihn dadurch inhibiert. Die direkte Bindestelle für Mad1-cMad2 am Kinetochor ist noch unklar, allerdings ist die Rekrutierung von Mps1 und Ndc80 abhängig. (Für Details siehe Text.)

Zunächst wird der Mad1-cMad2-Komplex ans unbesetzte Kinetochor rekrutiert, der über Mad1 stabil daran bindet. Mad1-cMad2 dient als Rezeptor und rekrutiert weiteres zytoplasmatisches oMad2. Durch die Dimerisierung von weiterem oMad2 mit dem cMad2 des Mad1-cMad2-Rezeptors wird die Bindung an Cdc20 erleichtert und es entsteht ein stabiler Cdc20-cMad2-Komplex. Durch die Bindung an Cdc20 entsteht erneut die Konformationsänderung von oMad2, da Mad1 und Cdc20 das gleiche Motif in Mad2 binden

(Luo *et al.*, 2002; Sironi *et al.*, 2002). Ein einzelnes unbesetztes Kinetochor reicht aus, um das SAC zu aktivieren, da vermutlich durch positive Rückkopplung von Cdc20-cMad2 weitere Cdc20-cMad2-Komplexe gebildet werden. Mad3 und Bub3 bilden bereits während des Zellteilungszyklus einen stabilen Komplex (Hardwick *et al.*, 2000) und binden unter SAC-Aktivierung an Cdc20-cMad2. Zur Rekrutierung von Mad3-Bub3 ans Kinetochor trägt vermutlich Bub1, Bub3 und Spc105 bei (Zich und Hardwick, 2009; London *et al.*, 2012).

In den letzten Jahren wurde die Struktur des MCC und dessen Bindung an den APC genauer untersucht. Interaktionsstudien des MCC zeigen, dass Mad2 und Mad3 sowohl an Cdc20 und Bub3 binden als auch miteinander interagieren (Hwang *et al.*, 1998; Hardwick *et al.*, 2000; Fraschini *et al.*, 2001). Außerdem ist die Bildung abhängig von Mad1, Mps1, Spc105 und Ndc80 (Musacchio und Salmon, 2007; Kemmler *et al.*, 2009; London *et al.*, 2012). Die Bindung von Mad2 an Cdc20 wird über die Mad2-Bindestelle vermittelt (Luo *et al.*, 2000; Sironi *et al.*, 2002). Dagegen enthält Mad3 zwei KEN-Boxen und eine D-Box, die *in vitro* zur Bindung an Cdc20 nötig sind. Es wird vermutet, dass Mad3 als Pseudosubstrat-Inhibitor für Cdc20 agiert (Burton und Solomon, 2007; Lara-Gonzalez *et al.*, 2011). Dafür spricht auch eine Strukturanalyse des MCC in der Spalthefe (Chao *et al.*, 2012), die zeigt, dass die WD40-Domäne von Cdc20 einen Rezeptor für die KEN-Box ausbildet und dieser durch Bindung von Mad3 für Substrate blockiert wird. Außerdem ist die N-terminale KEN-Box in Mad3 nötig für die SAC-Aktivierung (Burton und Solomon, 2007). Für eine effiziente Inhibition des APC sind Mad2 und Mad3 notwendig. Es wird vermutet, dass Mad3 die Bindung von Mad2 an Cdc20 über die Dimerisierungsstelle in Mad2 stabilisiert (Lau und Murray, 2012; Mariani *et al.*, 2012). Zunächst wurde vermutet, dass die Bildung des MCC Cdc20 daran hindert an den APC zu binden. Allerdings sprechen die Ergebnisse von Chao *et al.* (2012) und Herzog *et al.* (2009) dafür, dass der MCC an den APC bindet und dadurch die Aktivität hemmt. Dabei spielen vermutlich mehrere Mechanismen eine Rolle. Zum einen blockiert Mad3 die Substratbindestelle von Cdc20 und zum anderen ist die Position von Cdc20 durch den MCC so verändert, dass sich der D-Box-Rezeptor mit Doc1 nicht bilden kann. Außerdem ist die Mad2-Bindestelle in Cdc20 auch in der Lage mit dem APC zu interagieren, was aber vermutlich durch die Bindung von Mad2 an Cdc20 verhindert wird (Zhang und Lees, 2001; Izawa und Pines, 2012). Die Mad2-Cdc20 Bindung sorgt somit für ein verändertes Bindungsverhalten von Cdc20 zum APC. Zusätzlich wird die Aktivität des APC durch Autoubiquitinierung von Cdc20 inhibiert. Cdc20 ist im SAC abhängig von Mad2 und Mad3, aber nicht von Hct1 instabil (Pan und Chen, 2004; King *et al.*, 2007). Der niedrige Cdc20-Level ist notwendig für eine ausreichende Inhibition des APC. Foster und Morgan (2012)

konnten kürzlich zeigen, dass für die Autoubiquitinierung von Cdc20 die nicht essentielle Untereinheit Mnd2 des APC nötig ist und dass wahrscheinlich die Instabilität von Cdc20 neben der Stabilisierung des SAC auch für die Auflösung des MCC verantwortlich ist. Deshalb muss zur Aufrechterhaltung des SAC der MCC ständig neu gebildet werden. Die Funktion von Mnd2 scheint konserviert zu sein, da auch die verwandte humane Untereinheit Apc15 die Autoubiquitinierung im APC^{MCC} vermittelt (Uzunova *et al.*, 2012). Trotz der bereits beschriebenen Struktur und der Bindungsstellen des MCC an den APC sind viele Details noch nicht vollständig geklärt.

3.3.3 Inaktivierung des SAC

Der MCC und die APC-Inhibierung werden wieder aufgelöst, sobald alle Schwesterkinetochore bipolar mit Mikrotubuli besetzt sind. Allerdings ist der genaue Mechanismus der Inaktivierung noch unklar. Es wird vermutet, dass dazu mehrere Ereignisse notwendig sind, um eine schnelle Aktivierung des APC^{Cdc20} und damit eine akkurate Trennung der Chromosomen zu gewährleisten (Musacchio und Salmon, 2007; Zich und Hardwick, 2009; Kim und Yu, 2011). Eine Möglichkeit ist, dass die Komponenten des SAC nach Anheftung der Mikrotubuli mit Hilfe von Dynein-Motorproteinen, in *S. cerevisiae* vermutlich Kar3, entlang der Mikrotubuli in Richtung der SPK transportiert werden (Musacchio und Salmon, 2007; Kops und Shah, 2012). Durch die bipolare Anheftung der Kinetochore wird eine innerkinetochore Spannung erzeugt, wodurch Aurora B möglicherweise den Kontakt zu ihren Substraten verliert und so die Aktivierung des SAC durch Aurora B verhindert wird. Außerdem wird der CPC bei der Trennung der Chromosomen zur *spindle midzone* relokalisiert, wodurch eine Reaktivierung des SAC in der Anaphase verhindert wird (Mirchenko und Uhlmann, 2010).

In höheren Eukaryoten ist ein negativer SAC-Regulator p31^{comet} bekannt, der den Mad1-cMad2-Rezeptor sowie Cdc20-cMad2 bindet und dadurch die Dimerisierung von Mad2 verhindert. Außerdem ist p31^{comet} an der Auflösung des MCC beteiligt (Teichner *et al.*, 2011; Miniowitz-Shemtov *et al.*, 2012). Ähnlich wie p31^{comet} verhindert auch eine C-terminale Phosphorylierung von Mad2 die Bindung an Cdc20. Beides verhindert die Bildung weiterer MCC und dessen inhibierenden Effekts (Kim und Yu, 2011). Die Kinase, die Mad2 phosphoryliert, ist nicht bekannt, ebenso wenig ein homologes Protein von p31^{comet} in *S. cerevisiae*. Dagegen scheint in der Bäckerhefe die Protein-Phosphatase 1 (PP1) eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung des SAC zu spielen (Pinsky *et al.*, 2009). Die PP1 lokalisiert abhängig von Spc105 am Kinetochor und deren Interaktion wird durch Anheftung

von Mikrotubuli gefördert. Dort fungiert sie als Gegenspieler von Mps1 und Ipl1. PP1 dephosphoryliert zum einen Spc105, wodurch Komponenten wie Bub1 und Bub3, die zur Bildung des MCC notwendig sind, nicht mehr am Kinetochor lokalisieren können und zum anderen den Kinetochor-Komplex Dam1, wodurch die Mikrotubuli-Bindung und -Dynamik stabilisiert wird (Pinsky *et al.*, 2006; Lesage *et al.*, 2011; London *et al.*, 2012). Kürzlich wurde auch eine Beteiligung der Cdk1 beim Austritt aus dem SAC nachgewiesen. Einerseits scheint Cdk1 für die Koordination der Spindeldynamik und andererseits für die Aufrechterhaltung des Cdc20-Proteinlevels wichtig zu sein (Liang *et al.*, 2011). Die Autoubiquitinierung von Cdc20 destabilisiert Cdc20 während des SAC, allerdings ist Cdc20 trotzdem für den Beginn der Anaphase notwendig. Durch Stimulation der *CDC20*-Transkription sorgt Cdk1 für eine ständige Neusynthese von Cdc20. Auch die Autoubiquitinierung könnte einen Teil zur Inaktivierung des SAC beitragen, allerdings scheint nicht die Ubiquitinierung selbst den MCC zu zerstören, sondern es wird vermutet, dass eher die ATP-abhängige Proteolyse von Cdc20 dafür verantwortlich ist (Foster und Morgan, 2012). Somit kann neusynthetisiertes und MCC-freies Cdc20 wieder an den APC binden und die Anaphase einleiten. Die Degradation weiterer SAC-Komponenten wie Mps1 und des Pseudosubstrat-Inhibitor Mad3 fördert zusätzlich die Auflösung des SAC (Palframan *et al.*, 2006; King *et al.*, 2007).

3.3.4 Mps1 im Spindelkontrollsystem

Mps1 ist eine dual-spezifische Proteinkinase und ein wichtiger Regulator des Spindelkontrollsystems (Winey und Huneycutt, 2002; Liu und Winey, 2012). Darüber hinaus ist Mps1 essentiell für die Duplikation der SPK. Daher lokalisiert Mps1 am SPK und am Kinetochor (Castillo *et al.*, 2002). Die Lokalisation von Mps1 am Kinetochor ist vermutlich Ndc80 abhängig, da Mps1 mit dem N-terminalen Bereich von Ndc80 interagiert (Kemmler *et al.*, 2009). Der Proteinlevel von Mps1 fluktuiert während des Zellteilungszyklus ähnlich wie der von Clb2. Am Ende der Mitose sowie in G1 wird Mps1 APC^{Cdc20} und APC^{Hct1} abhängig degradiert (Palframan *et al.*, 2006; Ostapenko *et al.*, 2012). Somit entsteht eine doppelte negative Rückkopplung, da Mps1 über den SAC APC^{Cdc20} inhibiert und APC^{Cdc20} die Degradation von Mps1 vermittelt. Durch die Degradation von Mps1 wird vermutlich, wie durch die Relokalisation von Ipl1, auch eine Reaktivierung des SAC in der Anaphase verhindert.

Mps1 wird durch Autophosphorylierung aktiviert. Die Überexpression von Mps1 führt unabhängig von unbesetzten Kinetochoren zur Aktivierung des SAC und zur

Hyperphosphorylierung von Mad1 (Hardwick *et al.*, 1996). Die Funktion der Mad1-Phosphorylierung ist allerdings noch unklar. Weitere Substrate sind Ndc80 und Spc105, allerdings ist keine eindeutige Erkennungssequenz der Substrate bekannt.

Im Spindelkontrollsystem ist Mps1 notwendig für die Rekrutierung wichtiger SAC Komponenten wie Mad1, Mad2, Bub1 und Bub3 (Musacchio und Salmon, 2007; London *et al.*, 2012). Außerdem kontrolliert Mps1 in Kooperation mit Ipl1 durch Phosphorylierung von Dam1 die Anheftung der Mikrotubuli ans Kinetochor (Liu und Winey, 2012).

3.4 Cdc5 – die Polo-Kinase in *S. cerevisiae*

Polo-Kinasen sind multi-funktionelle Regulatoren des eukaryotischen Zellteilungszyklus und bis zum Menschen hoch konserviert (Archambault und Glover, 2009). Ihre Aufgaben erstrecken sich vom Eintritt bis zum Austritt aus der Mitose. Die Familie der Polo-Kinasen wurde nach ihrem zuerst entdeckten Vertreter in der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Polo) benannt (Llamazares *et al.*, 1991). Aufgrund ihres komplexeren Zellteilungszyklus haben Vertebraten mindestens zwei Polo-Kinasen. *D. melanogaster* haben neben Polo noch Plk4 (*polo-like kinase 4*) und Säuger besitzen sogar vier Vertreter, Plk1-4. Hefen haben lediglich eine Polo-Kinase, Cdc5 in *S. cerevisiae* und Plo1 in *Schizosaccharomyces pombe*, die wie Polo der humanen Plk1 am ähnlichsten sind (siehe Sequenzvergleich Abb. 3.4; Archambault und Glover, 2009). Polo-Kinasen sind essentiell für den Zellteilungszyklus und Plk1 ist sogar in der Lage *cdc5-1* Mutanten zu komplementieren, was für den hohen Grad der Konserviertheit spricht (Lee und Erikson, 1997).

Polo-Kinasen sind Ser/Thr-Kinasen und ihre Kinase-Domäne befindet sich im N-terminalen Bereich des Proteins. Die C-terminale Region enthält die für Polo-Kinasen charakteristische Polo-Box-Domäne (PBD). Diese besteht meist aus zwei Polo-Boxen und dient der Substratbindung (Abb. 3.5). Mit Hilfe der PBD werden spezifisch Phospho-Serin- bzw. Phospho-Threonin-Motive (S-pS/pT-P/X) gebunden (Elia *et al.*, 2003a; Elia *et al.*, 2003b). Außerdem ist die Polo-Box-Domäne wichtig für die Funktionalität und die Lokalisation der Polo-Kinasen (Lee *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2000). Mittlerweile sind mehrere Studien bekannt, die vermuten lassen, dass die PBD der Plk1 auch unphosphorylierte Substrate binden kann (Park *et al.*, 2010). Dazu zählt auch die intramolekulare Interaktion der PBD mit der Kinase-Domäne. Es wird vermutet, dass bis ein Substrat gebunden ist, die Kinase-Aktivität durch diesen intramolekularen Bindemechanismus reguliert wird. Grundsätzlich ist die Aktivität der Polo-Kinasen von der Phosphorylierung eines konservierten Threoninrests (T242 bei Cdc5 und T210 bei Plk1) innerhalb der Kinase-Domäne VIII abhängig, dem

EINLEITUNG

Aktivierungsloop (Abb. 3.4 und 3.5; Lee und Erikson, 1997; Mortensen *et al.*, 2005).
Zusätzlich werden die Polo-Kinasen über ihre Transkription und ihre Proteolyse reguliert.

Cdc5	MSLGPLKAINDKQLNTR RSKI VHTPIKGNADLVG KEN HFKQTKRLDPNNDHHQPAQ KKK	60
Polo	-----MAAKP-----EDKSTDI	12
Plk1	-----MSAAVTAGKLARAPADPGKAGVPGVAAPGAPAAAPPA KEI	40
Cdc5	REKL SALCKTPPSLIKTRGKDYHRGHFLGEGGFARCFQIKDD-SGEIFAAKTVAKASIKS	119
Polo	PDRIVDINQR-----KTYKRMRFEGKGGFAKCYEIIDVETDDVFAGKIVSKKLM IK	63
Plk1	PEVLVDPRSR-----RRYVRGRFLGKGGFAKCFEISDADTKEVFA GKIVPK SLLL K	91
Cdc5	EKTRKKLLSEIQIHKSMSHPNIVQFIDCFEDDSNVYILLEICPNGLMELL RRR VLTEP	179
Polo	HNQ KE TAQEITIHRSLNHPNIVKFNHYFEDSQNIYIVLELCKKRSMELHKRRKSIT EF	123
Plk1	PHQ RE KMSMEISIHRSIAHQHVGH GF FED ND FVFFVLELC RRR SLLEI HRRR ALTEP	151
Cdc5	EVRFFTTQICGAIKYMHSSRVIIHRDLKLGNIFFDSNYNLKIGDFGLAAVLANESERKYTI	239
Polo	ECRYIYQIIQ GV KYLHD NR IIHRDLKLGNIFFDLHLVKIGDFGLATRIEYEG ERKK TL	183
Plk1	EARYYLQIVL GC QYLH NR VIHRDLKLGNIFFDL EV KIGDFGLATKVEYD GERKK TL	211
Cdc5	CGT PNYIAPEVLMGKHS GH SFEVDIWSLGVMLYALLIGKPPFQARDVNTIYERIKCRD FS	299
Polo	CGTPNYIAPEILT-- K GH S FEVDIWSIGCVMYTLVGGPPFETKT LK DTYSKIKKCEYR	241
Plk1	CGTPNYIAPEVLS-- K GH S FEVDVWSIGCIMYTLVGGPPFETSLCKETYLR IK NEYS	269
Cdc5	FPRD KPI SDEGKILIRDILSLDPIERPSLITEIMDYVWFRGT-FPPSIPSTVMSE AP N ED	358
Polo	VP--SYLRKPAADMVIAMLQPNPESRPAIGQLLNFEFL KG SKVPMFLPSSCLTMA AP PRIGS	299
Plk1	IP-- KH INPV AA SLIQKMLQTDPTARPTINELLNDEFFTSGYIPARLEITCLTIP PR ESI	327
Cdc5	IPEEQSLVNFKDCMEKSLLESMS SD KIQ RQ KRDY SS IKSSIDKLEEHQNRPFPLPHSL	418
Polo	ND-----TIED SM HR KPL MEM NG IRPD DR LE ST FLKANLHDAIT	339
Plk1	AP-----SSLD PS NR KPL TV LN -----KGLENPLPER---PREK	358
Cdc5	SPGGTKQKYKEVVDIEAQRR LD AREARIRRAQQAVLRKELIATSTNVIKSEISLRILA	478
Polo	ASA-QVCRHSEDYRSDIESLYQQLTNLINGKPRILQGNLG DE NTD-----	383
Plk1	EEP-VVRE ET GEVVDCHL SD MLQQLHSVNASKPSEGLVRQ EE AED-----	402
Cdc5	SECHLTNLNGIVEAEAQYKMGGLPKSRL PK IKHPMI VT KWVDYSNKHGFSYQLSTEDIGVL	538
Polo	-----PAAQPLFWISKWVDYSDKYGF GY QL CD EGIGVM	416
Plk1	-----PACIPIFWISKWVDYSDKYGL GY QL CD NS SV GVVL	435
Cdc5	FNNGTIVLRLADAEFFWYISYDDREGWVASHYLLSEKPRELSRHLEVVDFFAKYMKANLS	598
Polo	FNDT TK LILLPNQINVHFI DKD GKE ----TYMTT TD YCKSLDKMKLLSYFKRYMIEHLV	472
Plk1	FNDSTRLILYNDG SL QY IE R D GTE----SYLTVSSHPNSLMKKITLL KY FRNYMSEHL	491
Cdc5	RVSTFGRE---EYHKDDV F LRRYTRYKPFVMFELSDGTFQFN-FKDHHKMAISDGGKLV T	654
Polo	KAGANNVNIESDQISRMPHLHSWFRTTCAVVM HL TNGSVQ LN -FSDHMKLILCPRMSA IT	531
Plk1	KAGANITPREGDELARLPYLRTWFRTRSAIIL HL SNGSVQ IN FE QD HTKLILCPLMAAV T	551
Cdc5	YISPSHESTTYPLVEVLKYGEIPGPESNFREKLTLLIKEGLKQKSTIVTVD---	705
Polo	YMDQEKNFRTYRFSTIVENGVS KD LYQK-IRYAQEKLRKM LE KMFT-----	576
Plk1	YID ER KRDFRTYRLSLEEYGCCKELAS R -LRYARTMVDKLL SS RSAS NRL KAS-	603

Abbildung 3.4 Sequenzvergleich der Polo-Kinasen Cdc5 aus *S. cerevisiae*, Polo aus *D. melanogaster* und der humanen Plk1

Vergleich der Proteinsequenzen der Polo-Kinasen aus *S. cerevisiae* (Cdc5), *D. melanogaster* (Polo) und dem Menschen (Plk1). Stark konservierte Positionen sind dunkelgrau hinterlegt, schwächer konservierte hellgrau oder fett dargestellt. Die D-Boxen sind pink, die KEN-Box türkis, die NLS grün und der konservierte Threoninrest, der für die Kinase-Aktivität notwendig ist, durch einen roten Buchstaben gekennzeichnet. Die Proteinsequenzen von Cdc5, Polo und Plk1 stammen aus der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programms ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) erstellt.

3.4.1 Regulation von Cdc5

Die Aktivität der Polo-Kinase Cdc5 wird zum einen durch zeitliche Kontrolle der Transkription, der Phosphorylierung und der Proteolyse reguliert und zum anderen durch die Lokalisation in verschiedenen Zellkompartimenten, die zum Teil über die PBD vermittelt wird (Archambault und Glover, 2009).

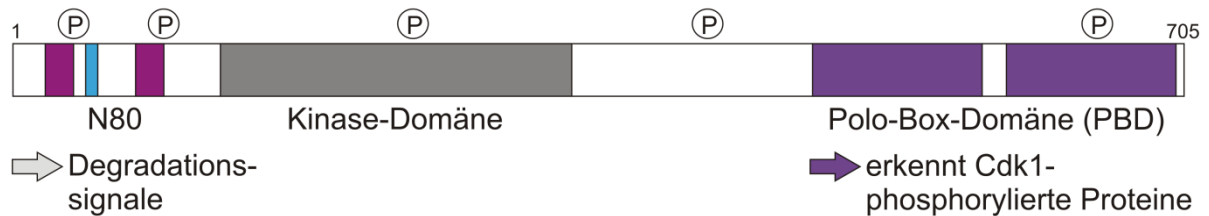


Abbildung 3.5 Schematischer Aufbau der Polo-Kinase Cdc5

Wie bei allen Polo-Kinasen, befindet sich die Kinase-Domäne (grau) im N-terminalen Bereich von Cdc5 und die Polo-Box-Domäne im C-terminalen Bereich (violett). Die PBD besteht aus zwei Polo-Boxen und bindet bevorzugt phosphorylierte Substrate. Für die Aktivität von Cdc5 ist die Cdk1-abhängige Phosphorylierung des Threoninrests T242 in der Kinase-Domäne notwendig. Cdc5 enthält vier weitere potentielle Cdk1-Phosphorylierungsstellen (als P dargestellt). Neben der Kinase-Domäne beinhaltet der N-Terminale Bereich die potentiellen Degradationssignale, zwei D-Boxen (pink) und eine KEN-Box (türkis).

Die Levels von Cdc5 fluktuieren während des Zellteilungszyklus wie die des Zyklins Clb2. Zu Beginn der S-Phase steigt die Expression und erreicht ihr Maximum in der frühen M-Phase. Am Ende der Mitose nimmt Cdc5 wieder ab und kann in der G1-Phase nicht detektiert werden (Kitada *et al.*, 1993; Charles *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998). *CDC5* gehört wie *CLB2* zu dem *CLB2*-Gencluster, dessen Transkription von *forkhead* Transkriptionsfaktoren (fTF) aktiviert wird (Zhu *et al.*, 2000). Cdc5 unterstützt die Aktivität der fTF und stimuliert so seine eigene Transkription (Darieva *et al.*, 2006).

Die Aktivität von Cdc5 fluktuiert parallel zu ihrer Expression und ist für die Zellen essentiell. Nicht nur die Deletion von *CDC5* ist letal (Kitada *et al.*, 1993), sondern auch die Inaktivierung der Kinase-Aktivität. Die Kinase-Aktivität von Cdc5 ist von der Phosphorylierung des Aktivierungsloops (T242) abhängig, da Zellen mit mutiertem T242A nicht lebensfähig sind (Mortensen *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung von T242 wird durch die Cdk1-Clb2 vermittelt. Die Proteinsequenz von Cdc5 enthält außerdem vier weitere Cdk1-Konsensussequenzen (Abb. 3.5), wovon T23, T70 und S419 *in vivo* phosphoryliert sind (Mortensen *et al.*, 2005). Die gleichzeitige Mutation dieser Phosphorylierungsstellen zu Alanin beeinträchtigen ebenfalls die Lebensfähigkeit der Zellen, sind aber nicht wie T242A letal (Arnold, 2008). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die zusätzlichen Cdk1-

Phosphorylierungen auch einen Einfluss auf die Kinase-Aktivität haben. Allerdings ist bis jetzt über die Funktion der weiteren Cdk1-Phosphorylierungen sehr wenig bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. Neuste Ergebnisse zeigen, dass T23 möglicherweise eine Rolle bei der Degradation von Cdc5 spielt (Simpson-Lavy und Brandeis, 2011).

Am Ende der Mitose und in der G1-Phase wird Cdc5 APC^{Hct1}-vermittelt degradiert (Charles *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998). Hierfür ist der N-terminale Bereich von Cdc5 notwendig, da die Deletion der 70 N-terminalen Aminosäuren zur Akkumulation von Cdc5 in der G1-Phase führt. Die N-terminale Domäne von Cdc5 enthält potentielle Degradationssignale, einerseits zwei D-Boxen und andererseits eine KEN-Box (siehe Abb. 3.4 und 3.5; Shirayama *et al.*, 1998; Michael *et al.*, 2008). Die Mutation der beiden D-Boxen gemeinsam stabilisiert Cdc5 nur partiell (Charles *et al.*, 1998). Ebenso führt die Mutation der KEN-Box nicht zur vollständigen Stabilisierung wie im Fall der Deletion des N-terminalen Bereichs (Arnold, 2008). Möglicherweise sind die D-Boxen und die KEN-Box zusammen für die Instabilität verantwortlich oder die N-terminale Region von Cdc5 enthält weitere noch unbekannte Degradationssignale.

Aufgrund der räumlich unterschiedlichen Substrate und der Abhängigkeit der Lokalisation von der Substratbindung, ist Cdc5 zellzyklusabhängig in unterschiedlichen Zellkompartimenten zu finden. Die Lokalisation von Cdc5 am Spindelpolkkörper und am Knospenhals ist abhängig von der PBD (Song *et al.*, 2000). Außerdem lokalisiert Cdc5 im Zellkern (Abb. 3.6). Die Plk1 enthält innerhalb der Kinase-Domäne eine NLS, die teilweise auch in Cdc5 konserviert ist (Taniguchi *et al.*, 2002) und vermutlich zur Kernlokalisation von Cdc5 beiträgt (Nakashima *et al.*, 2008).

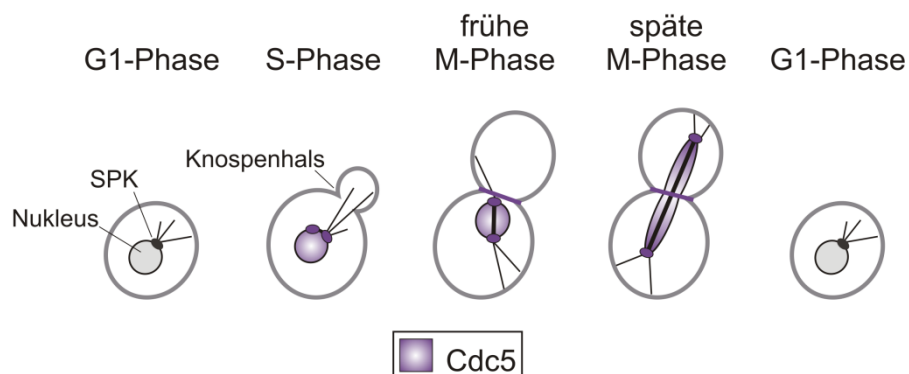


Abbildung 3.6 Lokalisation von Cdc5 während des Zellteilungszyklus

Cdc5 lokalisiert abhängig vom Zellzyklus am SPK, im Zellkern und am Knospenhals [verändert nach (Archambault und Glover, 2009)].

Zu Beginn der S-Phase ist Cdc5 zunächst am SPK sowie im Nukleus zu detektieren und ab dem G2/M-Phase-Übergang auch am Knospenhals. Am Ende der Mitose verschwindet das Cdc5-Signal in allen Kompartimenten und in der G1-Phase kann Cdc5 nicht detektiert werden (siehe Abb. 4.13; Lee *et al.*, 2005b). Das Auftreten von Cdc5 in den Zellen ist also sowohl zeitlich als auch räumlich reguliert.

3.4.2 Funktionen von Cdc5

Polo-Kinasen sind neben den Cdks wichtige Regulatoren des Zellteilungszyklus und multifunktionell (Archambault und Glover, 2009). Sie ermöglichen den Eintritt in die Mitose, fördern die Trennung der Schwesterchromatiden sowie den Austritt aus der Mitose und sind auch an der Zytokinese beteiligt.

Für den Eintritt in die Mitose ist die Aktivierung der Cdk1-Clb2 essentiell. Die Aktivität der Cdk1 wird durch Swe1 negativ und Mih1 positiv reguliert (Booher *et al.*, 1993; Sia *et al.*, 1996; Howell und Lew, 2012). Swe1 wiederum wird negativ durch Cdc5-abhängige Phosphorylierung reguliert, welche die Degradation von Swe1 induziert. Dazu wird Swe1 und auch Cdc5 Hsl1-abhängig an den Knospenhals rekrutiert (Bartholomew *et al.*, 2001; Sakchaisri *et al.*, 2004). Allerdings ist nicht nur die Cdk1-Aktivität von Cdc5 abhängig, sondern Cdc5 wird auch durch Cdk1 aktiviert. Neben der direkten Phosphorylierung und Aktivierung von Cdc5 fungiert Cdk1 als *priming* Kinase für Cdc5, indem sie die Cdc5-Substrate phosphoryliert, was die Bindung durch die PBD fördert. Da Cdk1 zusätzlich Swe1 phosphoryliert, wird dadurch die Cdc5-Aktivität stimuliert und es entsteht eine positive Rückkopplung, woraus schnell eine erhöhte Cdk1-Aktivität resultiert (Lee *et al.*, 2005a). Cdc5 und Cdk1 kooperieren außerdem bei der Stimulierung ihrer eigenen Transkription, da sowohl *CDC5* als auch *CLB2* dem *CLB2*-Gencluster angehören und die Transkription durch Cdc5- und Cdk1-abhängige Phosphorylierung der fTF induziert wird (Darieva *et al.*, 2006).

Auch bei der Trennung der Schwesterchromatiden spielen Cdc5 und Cdk1 eine gemeinsame Rolle. Cdk1 fördert die Aktivierung des APC^{Cdc20}, der die Degradation des Separase-Inhibitors Pds1 vermittelt. Dadurch wird die Separase Esp1 aktiv und kann die Kohäsintereinheit Scc1 spalten, wodurch die Trennung der Schwesterchromatiden ermöglicht wird. Cdc5 erleichtert die Spaltung des Kohäsins durch Hyperphosphorylierung von Scc1 (Alexandru *et al.*, 2001). Der Cdc5-abhängigen Phosphorylierung von Scc1 wirkt die Protein-Phosphatase PP2A^{Cdc55} entgegen (Yaakov *et al.*, 2012). PP2A^{Cdc55} wird durch Esp1 inhibiert, wodurch die Separase auch indirekt zur Spaltung des Kohäsins beiträgt.

Beim Austritt aus der Mitose ist Cdc5 essentiell für die Freisetzung von Cdc14 und ein wichtiger Regulator der beiden Signalwege FEAR und MEN (siehe 3.2.3). Cdc5 ist als einzige Komponente von FEAR und MEN in der Lage, nach Überexpression die Cdc14-Freisetzung aus dem Nukleolus in anderen Phasen als der Anaphase zu induzieren (Visintin *et al.*, 2003). Außerdem kann Cdc5 sowohl Net1 als auch Cdc14 phosphorylieren, wodurch die Affinität von Net1 zu Cdc14 verringert wird (Shou *et al.*, 2002; Yoshida und Toh-e, 2002; Visintin *et al.*, 2003). Die Interaktion von Cdc5 mit Cdc14 ist vermutlich direkt und PBD-abhängig (Rahal und Amon, 2008). Die Rückkehr von Cdc14 in den Nukleolus ist von der Degradation von Cdc5 abhängig (Visintin *et al.*, 2008) und unterstreicht die Wichtigkeit von Cdc5 in der Regulation von Cdc14. Die Funktion von Cdc5 innerhalb des FEAR-Signalwegs ist allerdings noch nicht vollständig verstanden. Einige Daten zeigen, dass die Net1-Phosphorylierung hauptsächlich von Cdk1 abhängig ist und Cdc5 in FEAR als Aktivator der Cdk1 agiert (Azzam *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2009). Möglich wäre aber auch, dass die Cdk1-abhängige Phosphorylierung von Net1 die Aktivität von Cdc5 in Bezug auf die Net1-Phosphorylierung erhöht und beide für eine effektive Freisetzung von Cdc14 durch FEAR notwendig sind (Manzoni *et al.*, 2010). Als MEN-Komponente reguliert Cdc5 über die Phosphorylierung von Bfa1 die Aktivität von Tem1 (Hu *et al.*, 2001). Neueste Untersuchungen zeigen, dass Cdc5 auch parallel zu Tem1 die Rekrutierung von Cdc15 an den SPK induziert und somit MEN aktiviert. Der genaue Mechanismus ist noch nicht klar, allerdings wäre es möglich, dass eine Cdc5-abhängige Phosphorylierung von Nud1, dem MEN-SPK-Gerüstprotein, eine Rolle spielt (Rock und Amon, 2011). Des Weiteren wurde kürzlich gezeigt, dass Cdc5 neben der inhibitorischen auch eine positive Wirkung auf Bfa1 hat. Es wird vermutet, dass Cdc5 durch Phosphorylierung von Bfa1 im C-terminalen Bereich die asymmetrische Lokalisation von Bfa1 am dSPK induziert (Kim *et al.*, 2012).

Zu den weiteren Funktionen von Cdc5 zählen die Beteiligung z. B. an der Regulation der SPK-Funktion (Maekawa *et al.*, 2007; Snead *et al.*, 2007; Ratsima *et al.*, 2011) und der Spindel-Dynamik (Park *et al.*, 2008), an der Regulation der Chromosomen-Kondensation (St-Pierre *et al.*, 2009), an der Ausbildung des Aktin-Myosin-Rings am Knospenhals (Yoshida *et al.*, 2006) und an der Adaptation des DNA-Schadenkontrollsystems (Toczyski *et al.*, 1997; Vidanes *et al.*, 2010).

Eine direkte Funktion von Cdc5 im Spindelkontrollsystem ist nicht bekannt, allerdings wird Mad3 Ipl1- und Cdc5-abhängig phosphoryliert (Rancati *et al.*, 2005). Außerdem wurde von Neutzner (2003) gezeigt, dass die Überexpression von Cdc5 zur Instabilität von Pds1 in Nocodazol-arretierten Zellen führt und Rossio *et al.* (2010) vermuten eine Beteiligung von

Cdc5 an der Adaptation des SAC. Zudem zeigten genetische Interaktionsstudien von erhöhten Cdc5-Mengen eine synthetische Letalität mit *bim1-Δ*, *kar3-Δ* und *cik1-Δ*, die zuvor für die SAC-Mutanten beschrieben wurden (Daniel *et al.*, 2006; Bittner, 2011). Diese Tatsachen deuten auf eine Funktion von Cdc5 im SAC hin. Die Daten zur SAC-Funktion der Plk1 in humanen Zellen sind kontrovers. Einerseits ist Plk1 für die Mad1-Phosphorylierung und die Mad1-Lokalisation am Kinetochor wichtig (Chi *et al.*, 2008), andererseits wird vermutet, dass Plk1 eher an der Inaktivierung des SAC beteiligt ist, da Plk1 für die Stabilisierung der initialen Interaktion zwischen Mikrotubuli und Kinetochor wichtig ist (Petronczki *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012a).

4 Ergebnisse

Die Polo-Kinase Cdc5 ist ein wichtiger Regulator des Zellteilungszyklus der Hefe *S. cerevisiae*, deren eigene Aktivität durch zellzyklusabhängige Expression, Phosphorylierung und Ubiquitin-vermittelte Degradation gesteuert wird (Lee *et al.*, 2005b; Mortensen *et al.*, 2005; Archambault und Glover, 2009). Der N-terminale Bereich von Cdc5 enthält potentielle Abbausignale und sollte genauer hinsichtlich des Einflusses auf Instabilität, Lokalisation und Funktion von Cdc5 untersucht werden. Neben der Proteolyse wurde die Regulation von Cdc5 auch bezüglich der Cdk1-abhängigen Phosphorylierungen analysiert. Dazu sollte die Funktion der Phosphorylierungen anhand des phänotypischen Effekts, der durch die Mutation der Cdk1-Phosphorylierungsstellen hervorgerufen wurde, charakterisiert werden. Viele Funktionen der Polo-Kinasen sind mittlerweile bekannt und im Gegensatz zu Cdc5 steht die humane Plk1 auch direkt in Verbindung mit dem Spindelkontrollsystem. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Funktion von Cdc5 im Spindelkontrollsystem zu identifizieren.

Es konnte anhand des Fusionsproteins Cdc5N80-GFP gezeigt werden, dass für die Instabilität in der G1-Phase einerseits die KEN-Box und andererseits die Kernlokalisation notwendig sind. Außerdem lassen die Ergebnisse vermuten, dass zusätzlich zu der Phosphorylierung der Kinase-Domäne auch die Phosphorylierung des N-terminalen Bereichs die biologische Aktivität von Cdc5 positiv beeinflusst. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch in *S. cerevisiae* die Polo-Kinase eine Rolle im SAC spielt. Vermutlich trägt Cdc5 zur Inaktivierung des SAC bei.

4.1 Regulation von Cdc5 durch den N-terminalen Bereich

Die Proteinmenge von Cdc5 fluktuiert während des Zellteilungszyklus vergleichbar wie die des Zyklins Clb2 (Charles *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998). Das Auftreten der beiden Proteine wird durch zellzyklusabhängige Expression des *CLB2*-Genclusters und APC^{Hct1}-vermittelte Degradation reguliert, wobei die Instabilität von Cdc5 durch den N-terminalen Bereich vermittelt wird. Die Stabilisierung durch die Deletion der N-terminalen Domäne von Cdc5 wurde bereits in G1-Phase-arretierten Zellen gezeigt (Shirayama *et al.*, 1998; Arnold, 2008). Hier wurde der Einfluss der Deletion der 72 N-terminalen Aminosäuren auf die Fluktuation von Cdc5 im Zellteilungszyklus anhand eines Synchronexperiments untersucht. Dazu wurden die Zellen mit dem Paarungspheromon α -Faktor in der G1-Phase arretiert und nach Erreichen des Arrests synchron in den nächsten

Zellteilungszyklus entlassen. Durch erneute Zugabe des α -Faktors durchliefen die Zellen exakt einen Zyklus und arretierten schließlich wieder in G1. Die Proteinlevel von Cdc5 und Clb2 wurden anhand einer Westernblot-Analyse verfolgt und mittels Durchflusszytometrie der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt, um das synchrone Durchlaufen des Zellzyklus der untersuchten Stämme zu überprüfen.

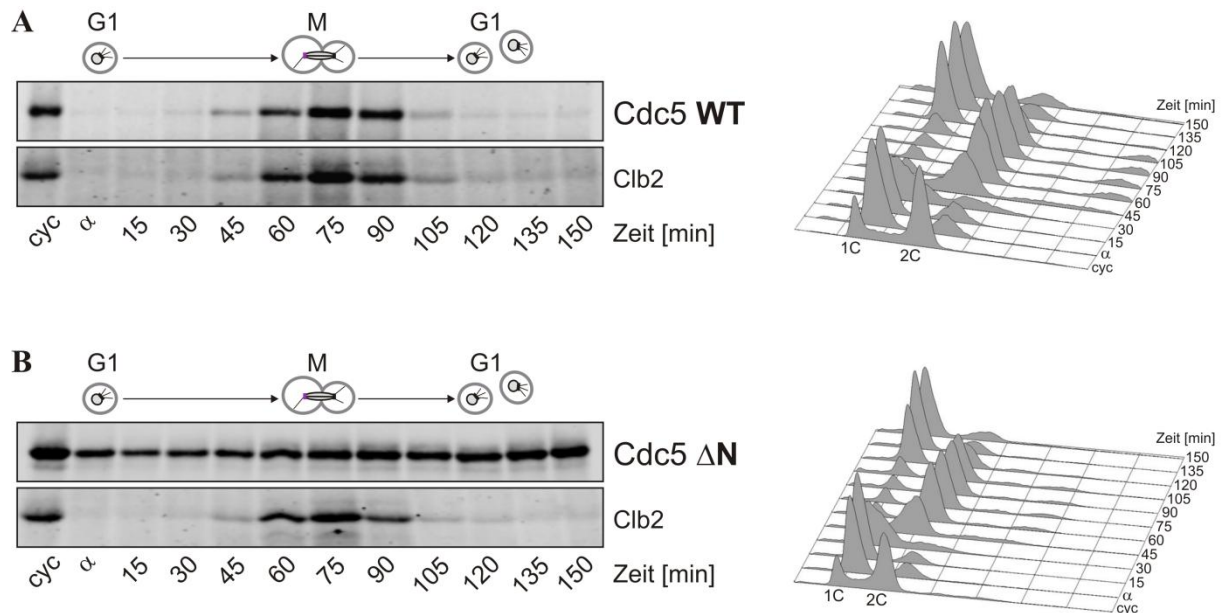


Abbildung 4.1 Fluktuation von Cdc5 und Cdc5ΔN während des Zellteilungszyklus

Die Zellen der Stämme (A) W6842 (*MATa bar1-Δ::HIS3 leu2::pCDC5-CDC5-MYC9-LEU2*) und (B) W6844 (*MATa bar1-Δ::HIS3 leu2::pCDC5-cdc5ΔN72-MYC9-LEU2*) wurden in XYD angezogen und bis zu ihrer exponentiellen Wachstumsphase bei 25°C kultiviert. Durch Zugabe des Paarungspheromons α -Faktor (50 ng/μl) arretierten die Zellen in der G1-Phase. Nach 3 h Arrest wurden die Zellen in pheromonfreies Medium umgesetzt und nach 60 min erneut α -Faktor zugegeben, so dass die Zellen nach Durchlaufen eines Zellteilungszyklus wieder in der G1-Phase arretieren. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die Westernblot-Analyse sowie die Durchflusszytometrie geerntet und aufgearbeitet. In der Westernblot-Analyse wurden Cdc5 und Cdc5ΔN über ihr C-terminales MYC9-Epitop mit dem α -myc-Antikörper 9E10 und Clb2 mittels α -Clb2-Serum nachgewiesen. Für die Durchflusszytometrie wurde die DNA mit Sytox Green gefärbt und anschließend der DNA-Gehalt der Zellen gemessen (1C = G1-Phase und 2C = G2- und M-Phase).

Im Gegensatz zu Cdc5 fluktuierte das N-terminal verkürzte Cdc5-Derivat (Cdc5ΔN) kaum während des Zellteilungszyklus. Bereits in der G1-Phase war Cdc5ΔN vorhanden und akkumulierte nach dem Durchlaufen der M-Phase in der nächsten G1-Phase in einem höheren Level (Abb. 4.1 B). Clb2, wie auch Cdc5 (Abb. 4.1 A), war in der G1-Phase nicht nachzuweisen. Zu Beginn der M-Phase stieg die Expression der beiden Proteine an und erreichte ihr Maximum 75 min nach dem G1-Arrest. Danach nahm das Signal von Clb2 und Cdc5 wieder ab und war nach 120 min nicht mehr zu detektieren (Abb. 4.1). Da in beiden

Stämmen Clb2 vergleichbar fluktuierte und die DNA-Profile ein gleichmäßiges Durchlaufen der Zellen des Zellzyklus zeigten (Abb. 4.1), lässt sich daraus schließen, dass die Expression des stabilen Cdc5-Derivats keinen Einfluss auf das Fortschreiten des Zellzyklus hatte. Die Deletion des N-terminalen Bereichs scheint neben dem Einfluss auf die Stabilität dennoch einen Einfluss auf die Funktionalität von Cdc5 zu haben, was frühere Daten zeigen (Arnold, 2008) und auch unter 4.3.7 bestätigt wurde.

4.2 Instabilität und Lokalisation von Cdc5N80-GFP

Der N-terminale Bereich von Cdc5 enthält zwei D-Boxen und eine KEN-Box (Abb. 4.2 A). Bisherige Daten zeigen, dass die beiden D-Boxen einen, wenn auch nur geringen, Beitrag zur Instabilität von Cdc5 leisten (Charles *et al.*, 1998). Zusätzlich gibt es erste Hinweise, dass auch die KEN-Box für die Degradation von Cdc5 wichtig ist (Arnold, 2008).

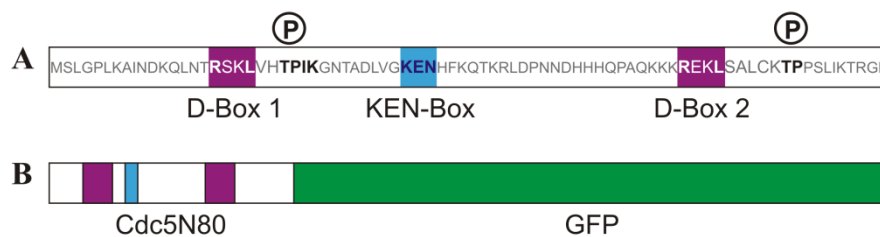


Abbildung 4.2 N-terminaler Bereich von Cdc5 und das Fusionsprotein Cdc5N80-GFP

(A) Der N-terminale Bereich von Cdc5 enthält einerseits potentielle Abbausignale, zwei D-Boxen (violett) und eine KEN-Box (türkis) und andererseits zwei Cdk1-Phosphorylierungsstellen, die mit einem P markiert sind.
(B) Die ersten 80 N-terminalen Aminosäuren von Cdc5 (N80) wurden an GFP fusioniert (Cdc5N80-GFP).

Um den Einfluss der möglichen Abbausignale genauer zu analysieren, wurden die ersten 80 Aminosäuren von Cdc5 (Cdc5N80) an GFP fusioniert (Abb. 4.2 B). Die Instabilität des Fusionsproteins Cdc5N80-GFP wurde mit Hilfe von *live-cell imaging* und mittels Westernblot-Analysen *in vivo* untersucht.

4.2.1 Cdc5N80 ist hinreichend für Instabilität und Lokalisation im Zellkern

Um die Instabilität und die Lokalisation von Cdc5N80-GFP zu untersuchen, wurde das DNA-Konstrukt zunächst unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors *pTEF2* exprimiert und anschließend das Fusionsprotein Cdc5N80-GFP am konfokalen Mikroskop verfolgt. Zur Visualisierung des Zellkerns wurde ein stabiles mCherry-NLS Fusionsprotein (siehe 6.3.3) verwendet. Es wurden Zeitrafferaufnahmen im Abstand von fünf Minuten für die Dauer von zwei Stunden gemacht und anschließend die Signalintensitäten quantifiziert.

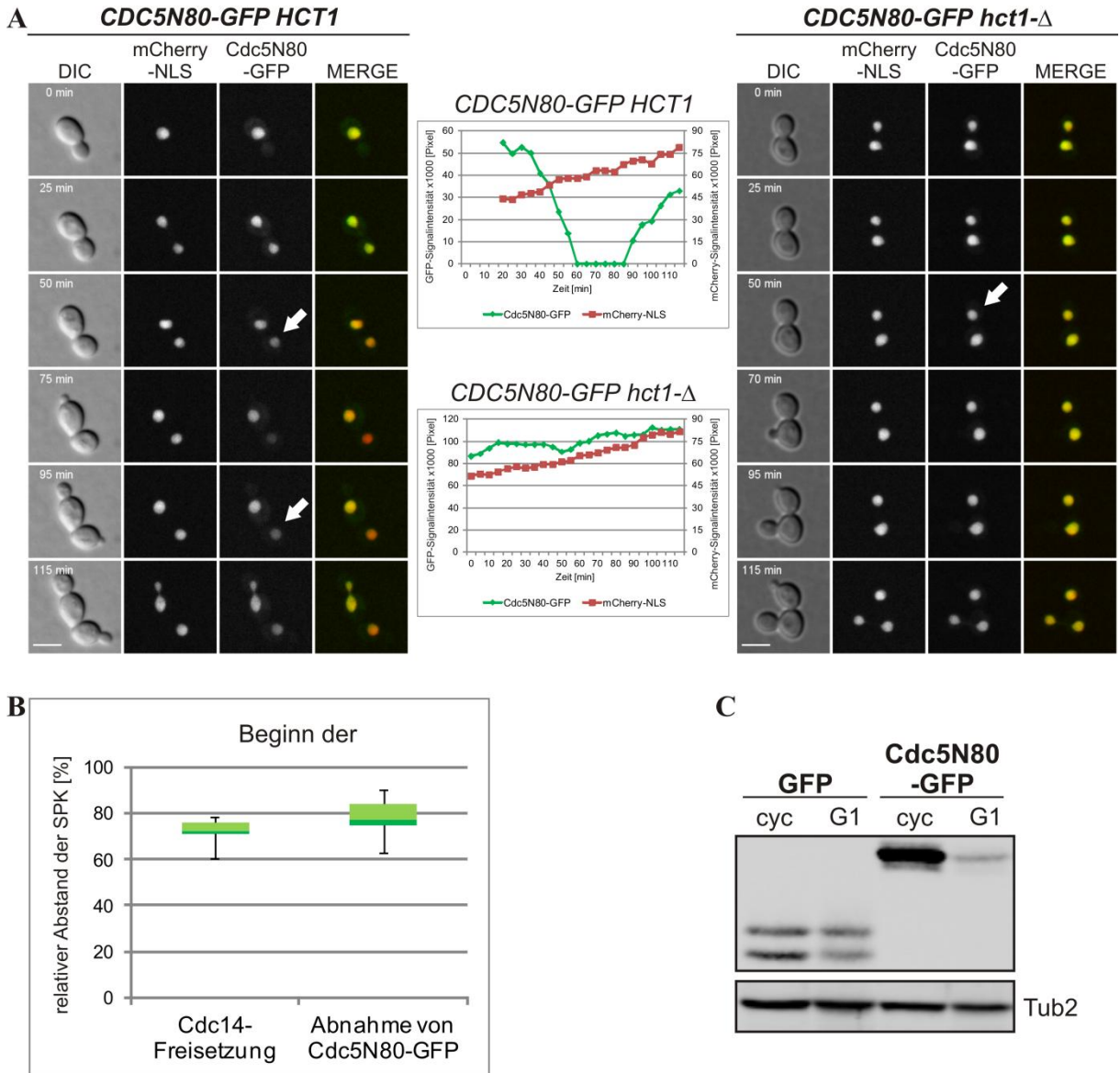


Abbildung 4.3 Der N-terminale Bereich von Cdc5 ist hinreichend für Instabilität in der G1-Phase und Lokalisation im Zellkern

Der Abbau des Fusionsproteins Cdc5N80-GFP wurde *in vivo* mittels *live-cell imaging* verfolgt (A). Dazu wurden die Zellen der Stämme W9312 (*leu2::pTEF2-MYC3-cdc5N80-GFP-tCYC1-LEU2 ura3::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-URA3*) und W10982 (*leu2::pTEF2-MYC3-cdc5N80-GFP-tCYC1-LEU2 ura3::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-URA3 hct1-4::HIS3*) in XYD bei 25°C angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase mit SD++-Agar für die Mikroskopie präpariert. Für 2 h wurde alle 5 min ein Z-Stapel aus 10 Ebenen mit einer Distanz von je 0,5 µm und einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Cdc5N80-GFP wurde mit 2% des 488 nm Lasers und mCherry-NLS mit 12% des 561 nm Lasers detektiert. Die Z-Stapel wurden mit Image J projiziert (maximale Intensität) und ausgewählte Zeitpunkte dargestellt. Zur Quantifizierung der Signale, wurden die Signale addiert und der Hintergrund subtrahiert. Die Diagramme zeigen die Signalintensitäten der jeweiligen Tochterzellen (Pfeil) in Abhängigkeit der Zeit.

Zur Bestimmung des Abbaubeginns von Cdc5N80-GFP (B) wurden die Zellen des Stammes W11995 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-tCYC1-URA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*) in XYR bei

25°C angezogen und der *GALI*-Promotor für 60 min mit 2% Galaktose in der exponentiellen Wachstumsphase induziert. Anschließend wurden die Zellen in XYD gewaschen und mit SD++-Agarose mikroskopiert (488 nm Laser: 5%, 561 nm Laser: 50%). Die Zellen des Stammes W10990 (*CDC14-GFP-tCYC1-URA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*) wurden in XYD angezogen und ebenfalls in der exponentiellen Wachstumsphase für die Mikroskopie präpariert (488 nm Laser: 15%, 561 nm Laser: 75%). Es wurden Zeitrafferaufnahmen ($t = 5$; $z = 10$; $d = 0,5 \mu\text{m}$) gemacht und der Abbaubeginn bzw. der Beginn der Cdc14-Freisetzung anhand des Abstandes zwischen den beiden Spindelpolkörpern bestimmt. Es wurden je 10 Zellen quantifiziert und die Ergebnisse in einem Boxplot-Diagramm verglichen.

Zur Analyse des Abbaus von Cdc5N80-GFP mittels Westernblot (C) wurden die Zellen der Stämme W9248 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGALI-MYC3-GFP-tCYC1-URA3*) und W9250 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGALI-MYC3-cdc5N80-GFP-tCYC1-URA3*) in XYR bei 25°C angezogen und der *GALI*-Promotor für 2 h mit 2% Galaktose in der exponentiellen Wachstumsphase induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (cyc). Für die Expression in der G1-Phase wurden die exponentiell wachsenden Kulturen 3 h mit α -Faktor (50 ng/ml) behandelt und anschließend der *GALI*-Promotor wie zuvor induziert (G1). In der Westernblot-Analyse wurden GFP und Cdc5N80-GFP über ihr N-terminales MYC3-Epitop mit dem α -myc-Antikörper 9E10 und Tubulin (Tub2) mittels α -Tub2-Serum nachgewiesen. Tubulin diente dabei als Ladekontrolle und die aufgetragenen Proben wurden auf das jeweilige Tubulin-Signal normiert.

Die Mikroskopie-Daten zeigten, dass der N-terminale Bereich von Cdc5 einen Einfluss auf die Lokalisation von GFP hatte. Das Fusionsprotein Cdc5N80-GFP lokalisierte ausschließlich im Zellkern (Abb. 4.3 A), wohingegen GFP hauptsächlich im Zytoplasma zu detektieren war (Abb. 4.5 A). Aufgrund der Lokalisation des Fusionsproteins im Zellkern lässt sich folgern, dass der N-terminale Bereich von Cdc5 neben den Degradationssignalen eine NLS enthält.

Zusätzlich zeigten die Mikroskopie-Daten, dass das Fusionsprotein Cdc5N80-GFP während des Zellteilungszyklus wie Cdc5 fluktuierte. Das Signal verschwand trotz konstitutiver Expression, sobald die Zellen die G1-Phase erreichten und wurde wieder sichtbar, als sie in den nächsten Teilungszyklus eintraten (Abb. 4.3 A links). Besonders gut ließ sich diese Fluktuation bei Tochterzellen beobachten (Abb. 4.3 Pfeil), weil deren G1-Phase länger andauert, um die nötige Zellgröße für das Eintreten in den Zellzyklus zu erreichen.

Da die Degradation von Cdc5 durch den APC und dessen Co-Aktivator Hct1 vermittelt wird (Charles *et al.*, 1998), wurde untersucht, ob es sich bei der Abnahme des Cdc5N80-GFP-Signals ebenfalls um eine Hct1-vermittelte Degradation handelt. Dazu wurde die Instabilität von Cdc5N80-GFP in *hct1-Δ* Mutanten getestet (Abb. 4.3 A rechts). In der *hct1-Δ* Mutante konnte Cdc5N80-GFP während der Mitose sowie in der G1-Phase detektiert werden. Da Cdc5N80-GFP in *hct1-Δ* Mutanten nicht mehr zellzyklusspezifisch reguliert wurde, sondern stabilisiert war, lässt sich daraus schließen, dass der Abbau von Cdc5N80-GFP über APC^{Hct1} vermittelt wird.

Als Nächstes wurde der Beginn der APC^{Hct1}-vermittelten Degradation von Cdc5N80-GFP analysiert. Dazu wurde die Expression von Cdc5N80-GFP unter die Kontrolle des induzierbaren Promotors *pGAL1* gestellt. Die Expression wurde für 60 min mit 2% Galaktose induziert und anschließend der Abbau von Cdc5N80-GFP am Mikroskop verfolgt. Zur zeitlichen Einordnung der Degradation wurde der Abstand der SPK gemessen und die Freisetzung der Phosphatase Cdc14 aus dem Nukleolus in den Zellkern und das Zytoplasma betrachtet. Das Auftauchen von Cdc14 am dSPK wurde als Beginn der Cdc14-Freisetzung gewertet. Die Cdc14-Freisetzung begann, wenn etwa 70% des maximalen Abstands der SPK erreicht waren. Dagegen begann der Abbau von Cdc5N80-GFP etwas später, wenn die Entfernung der SPK ca. 80% betrug (Abb. 4.3 B). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Degradation von Cdc5 ausschließlich durch Hct1 vermittelt wird, da der Abbau erst nach der Freisetzung von Cdc14 begann, die für die Aktivierung des APC^{Hct1} notwendig ist (Jaspersen *et al.*, 1999).

Zudem konnte auch mittels Westernblot-Analyse gezeigt werden, dass Cdc5N80-GFP im Gegensatz zu GFP in der G1-Phase sehr instabil ist. Dazu wurden Cdc5N80-GFP und GFP in asynchron wachsenden und in G1-arretierten Zellen 120 min durch Induktion des *GAL1*-Promotors überexprimiert und anschließend die Proteinlevel im Westernblot detektiert. Trotz Überexpression von Cdc5N80-GFP konnte in G1-Zellen im Vergleich zu asynchron wachsenden Zellen (*cyc*) kaum ein sichtbares Signal detektiert werden. Im Gegensatz dazu war das GFP-Signal der asynchronen Kultur etwa genauso stark wie das der G1-Zellen (Abb. 4.3 C).

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass der N-terminale Bereich von Cdc5 nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für die Instabilität in der späten Mitose sowie der G1-Phase ist und dass dieser eine NLS enthält.

4.2.2 KEN-Box und D-Boxen tragen zur Instabilität von Cdc5 bei

Da die D-Boxen nur einen geringen Teil zur Instabilität von Cdc5 beitragen, jedoch die KEN-Box für dessen Abbau auch nötig ist (Charles *et al.*, 1998; Arnold, 2008), wurde die Relevanz der vorhandenen Degradationssignale mittels Cdc5N80-GFP-Derivaten analysiert. Dazu wurden zunächst die Derivate des Fusionsproteins Cdc5N80-GFP hergestellt, bei denen die Konsensussequenz der Abbausignale mutiert war. Anschließend wurde die Instabilität von GFP und den Cdc5N80-GFP-Derivaten in der G1-Phase bestimmt. Zur Herstellung einer D-Box-Mutante Cdc5N80db1/2-GFP, wurden die beiden D-Boxen durch Punktmutationen von RXXL zu AXXA zerstört (Abb. 4.4 C). Die KEN-Box-Mutante Cdc5N80KENm-GFP

wurde durch den Austausch von K35 und E36 zu je Alanin erzeugt (Abb. 4.4 D). Für die Durchführung des Experiments wurde die Expression von GFP und den Fusionsproteinen unter die Kontrolle des induzierbaren *GALI*-Promotors gestellt und die Zellen mit Hilfe des Paarungspheromons α -Faktor in der G1-Phase arretiert. Anschließend wurde die Überexpression für 120 min induziert und der 0-Wert geerntet. Nach der Repression des Promotors wurden weitere Zeitwerte genommen und die Abnahme der Signale in der Westernblot-Analyse verfolgt sowie quantifiziert. Zusätzlich wurde der DNA-Gehalt der Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen, um den Arrest der Zellen in der G1-Phase zu überprüfen.

Wie bereits unter 4.2.1 gesehen, war GFP in der G1-Phase stabil. Der Proteinlevel von GFP blieb über die Dauer des Experiments konstant (Abb. 4.4 A und E). Dagegen war Cdc5N80-GFP bereits zu Beginn nur schwach zu detektieren und nach 30 min verschwunden (Abb. 4.4 B und E). Die Mutation der beiden D-Boxen hatte zur Folge, dass Cdc5N80db1/2-GFP teilweise stabilisiert war. Nach 75 min konnte ein, wenn auch nur sehr schwaches, Signal von Cdc5N80db1/2-GFP detektiert werden. Die Abnahme von Cdc5N80db1/2-GFP war deutlich langsamer als die von Cdc5N80-GFP (Abb. 4.4 C und E). Im Gegensatz zu den Mutationen der D-Boxen, war Cdc5N80-GFP aufgrund der Mutation der KEN-Box deutlicher stabilisiert. Cdc5N80KENm-GFP war auch nach 75 min noch gut nachweisbar (Abb. 4.4 D und E). Daraus lässt sich schließen, dass die KEN-Box eine bedeutendere Rolle bei der Instabilität von Cdc5N80-GFP spielt als die beiden D-Boxen zusammen.

Anhand der DNA-Profile zeigte sich, dass der Arrest der Zellen in der G1-Phase über die Dauer des Experiments bei allen Stämmen vollständig war (1C = G1-Phase, Abb. 4.4 A – D). Um auszuschließen, dass die Unterschiede der Abbauraten aufgrund von unterschiedlichen Expressionsniveaus hervorgerufen wurden, wurde die Expression der Fusionsproteine zusätzlich in asynchron wachsenden Kulturen (cyc) durchgeführt und mit dem Proteinlevel in G1 verglichen. Die Westernblot-Analyse der Cdc5N80-GFP-Derivate zeigte, dass die asynchronen Expressionslevel der Mutanten etwa gleich waren, jedoch etwas schwächer als der von Cdc5N80-GFP (Abb. 4.4 F). Im Vergleich dazu, war die Abnahme des Signals in G1 wiederum bei Cdc5N80-GFP am stärksten, da nur noch 6% des cyc-Wertes vorhanden war. Im Bezug auf den asynchronen Expressionslevel der Mutanten, zeigte sich wie bei den Abbauraten, dass die Mutation der KEN-Box eine stärkere Stabilisierung von Cdc5N80-GFP zur Folge hatte als die Mutation der beiden D-Boxen zusammen. Der Expressionslevel von Cdc5N80KENm-GFP war etwa 10% höher als der von Cdc5N80db1/2-GFP (Abb. 4.4 F).

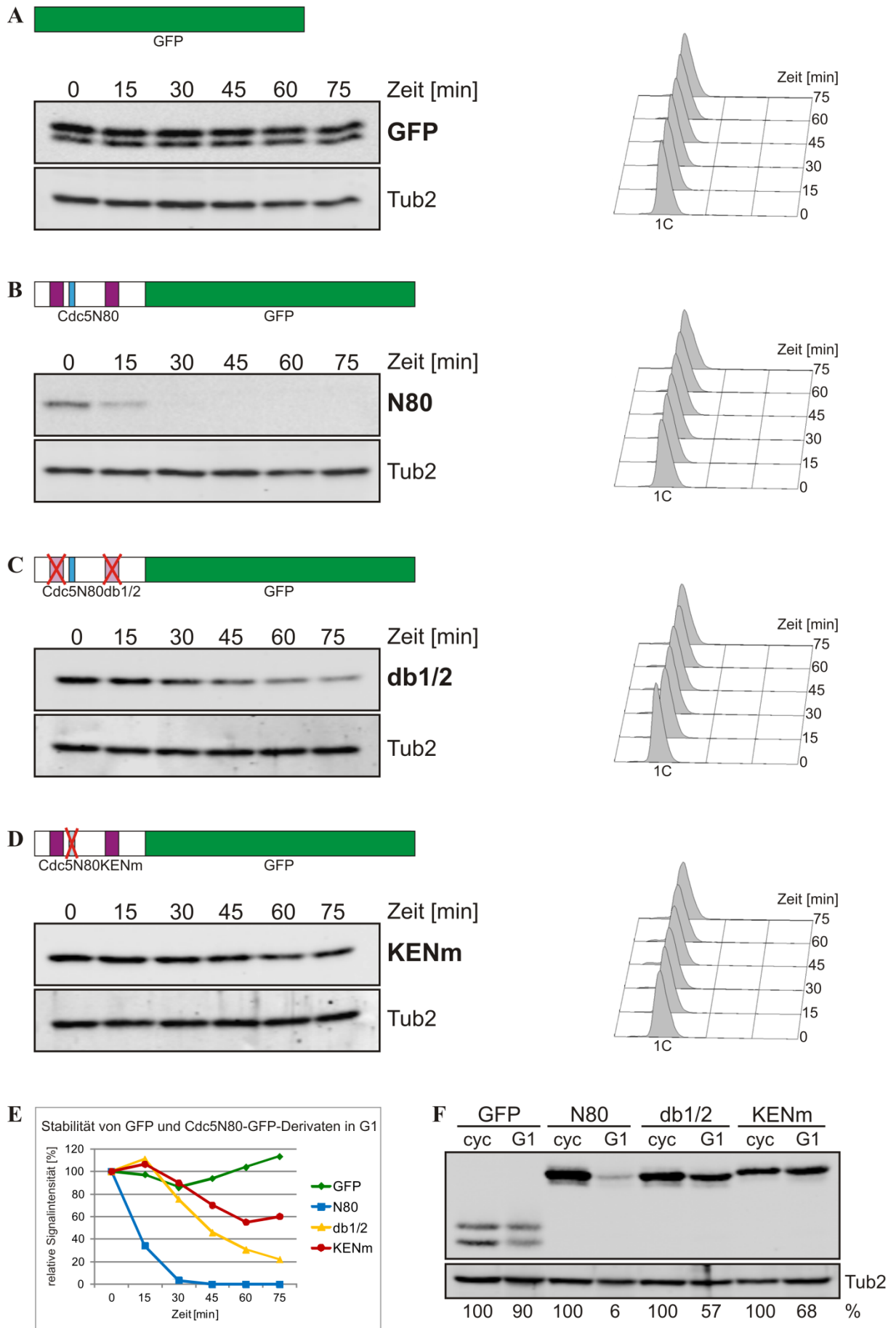


Abbildung 4.4 KEN-Box trägt mehr zur Instabilität von Cdc5 bei als die beiden D-Boxen

Die Zellen der Stämme (A) W9248 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-GFP-tCYC1-URA3*), (B) W9250 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-tCYC1-URA3*), (C) W9600 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80db1/2-GFP-tCYC1-URA3*) und (D) W9601 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80KENm-GFP-tCYC1-URA3*) wurden in XYR bei 25°C angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe des Paarungspheromons α -Faktor (50 ng/ml) in der G1-Phase arretiert. Nach 3 h Arrest wurde der *GAL1*-Promotor für 120 min mit 2% Galaktose induziert und anschließend der 0-Wert geerntet. Die restlichen Zellen wurden in XYD mit α -Faktor (50 ng/ml) umgesetzt, um den Promotor wieder zu reprimieren. Es wurden Proben 15, 30, 45, 60 und 75 min nach der Repression des *GAL1*-Promotors für die Westernblot-Analyse sowie die Durchflusszytometrie geerntet und aufgearbeitet. In der Westernblot-Analyse wurden GFP und die Cdc5N80-GFP-Derivate über ihr N-terminales MYC3-Epitop mit dem α -myc-Antikörper 9E10 und Tubulin (Tub2) mittels α -Tub2-Serum nachgewiesen. Tubulin diente dabei als Ladekontrolle. Anhand der Durchflusszytometrie wurde der DNA-Gehalt der Zellen gemessen und der vollständige Arrest der Zellen in der G1-Phase überprüft (1C = G1-Phase).

Für die Quantifizierung der Abbaukurven (E), wurden die Intensitäten der myc-Signale gemessen und durch das jeweilige Tubulin-Signal dividiert, um Schwankungen der aufgetragenen Proteinmengen zu berücksichtigen. Von den normierten Messwerten wurde der 0-Wert als 100% definiert und für die restlichen Zeitwerte der Quotient aus $[t_{\text{myc}}\text{-Wert}/0_{\text{myc}}\text{-Wert}]$ gebildet. Im dargestellten Diagramm wurden die relativen Signalintensitäten in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen.

Um die Expressionslevel von GFP und den Cdc5N80-GFP-Derivaten in asynchronen (cyc) und G1-Zellen zu vergleichen (F), wurden die Zellen in XYR bei 25°C angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase der *GAL1*-Promotor für 120 min mit 2% Galaktose induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und für die Westernblot-Analyse aufgearbeitet. Für die Expression in der G1-Phase (G1) wurde der 0-Wert des G1-Abbau-Experiments siehe A – D verwendet. Der Nachweis von GFP und den Cdc5N80-GFP-Derivaten erfolgte über ihr N-terminales MYC3-Epitop mit dem α -myc-Antikörper 9E10. Tubulin diente als Ladekontrolle und wurde mit dem α -Tub2-Serum nachgewiesen. Die Proben wurden unter Berücksichtigung des Tubulin-Signals aufgetragen und die Expressionslevel, wie unter (E) beschrieben, quantifiziert. Der cyc-Wert wurde als 100% definiert und für den G1-Wert der Quotient aus $[G1_{\text{myc}}\text{-Wert}/cyc_{\text{myc}}\text{-Wert}]$ gebildet.

Neben der Westernblot-Analyse wurden auch die Instabilität und die Lokalisation von GFP und den Fusionsproteinen im Mikroskop untersucht. Dazu wurde die Expression für 60 min induziert und anschließend die Signale im Mikroskop beobachtet. Zur Visualisierung des Zellkerns wurde erneut das mCherry-NLS Fusionsprotein verwendet.

GFP lokalisierte gleichmäßig verteilt im Zytoplasma und zu einem geringen Teil auch im Zellkern. Es waren sowohl G1- als auch mitotische Zellen mit einem GFP-Signal zu sehen (Abb. 4.5 A). Dadurch wurde das Ergebnis aus der Westernblot-Analyse bestätigt, dass GFP stabil war. Wie unter konstitutiver Expression, war Cdc5N80-GFP ausschließlich im Zellkern lokalisiert und im Gegensatz zur M-Phase in der G1-Phase nicht zu detektieren (Abb. 4.5 B). Interessanterweise führte die Mutation der beiden D-Boxen zu einer deutlichen Veränderung

der Lokalisation. Neben der Lokalisation im Zellkern akkumulierte Cdc5N80db1/2-GFP im Zytoplasma und war in mitotischen Zellen sowie in G1-Zellen, wenn auch etwas schwächer, nachweisbar (Abb. 4.5 C). Die Mutation der KEN-Box hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation des Fusionsproteins. Cdc5N80KENm-GFP war genauso wie Cdc5N80-GFP nur im Zellkern zu detektieren. Allerdings waren anders als bei Cdc5N80-GFP auch G1-Zellen mit Signal zu sehen (Abb. 4.5 D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die KEN-Box als auch die D-Boxen einen Beitrag zur Instabilität von Cdc5N80-GFP leisten, wobei die Mutation der KEN-Box eine deutlichere Stabilisierung hervorruft. Zudem werfen die Ergebnisse die Frage auf, ob die Fehllokalisation im Zytoplasma die Stabilität von Cdc5N80db1/2-GFP beeinflusst.

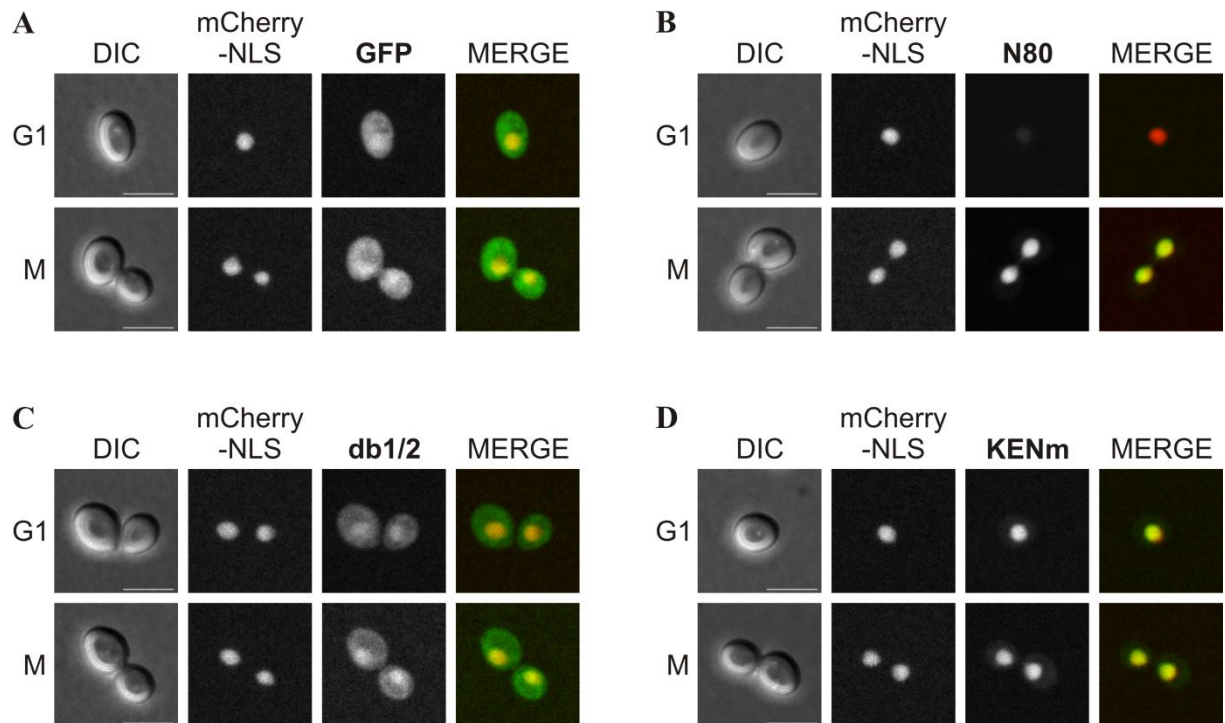


Abbildung 4.5 Mutation der D-Boxen beeinflusst die Lokalisation von Cdc5N80-GFP im Zellkern

Die Zellen der Stämme (A) W11999 (*ura3::pGAL1-MYC3-GFP-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*), (B) W11085 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*), (C) W11314 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80db1/2-GFP-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*) und (D) W11315 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80KENm-GFP-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*) wurden in XYR angezogen und der *GAL1*-Promotor für 60 min mit 2% Galaktose in der exponentiellen Wachstumsphase bei 25°C induziert. Anschließend wurden die Zellen mit SRG++-Agarose für die Mikroskopie präpariert. Es wurden Z-Stapel mit 10 Ebenen und einer Distanz von 0,5 µm sowie einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. GFP und Cdc5N80db1/2-GFP wurde mit 10% des 488 nm Lasers, Cdc5N80-GFP und Cdc5N80KENm-GFP mit 5% des 488 nm Lasers und mCherry-NLS mit 15% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Axio Vision-Software projiziert und für die jeweiligen Zellzyklusstadien repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 µm).

4.2.3 Kernlokalisierung von Cdc5N80-GFP ist notwendig für Instabilität

Aufgrund der beobachteten Fehllokalisierung von Cdc5N80db1/2-GFP im Zytoplasma wäre es denkbar, dass die Lokalisation die Instabilität in der G1-Phase beeinflusst und dass aufgrund dessen fehllokalisiertes Cdc5N80db1/2-GFP stabiler ist. Um dies zu überprüfen, wurde eine NLS an GFP, Cdc5N80-GFP und die fehllokalisierte D-Box-Mutante Cdc5N80db1/2-GFP fusioniert. Als NLS wurde ein C-terminales Fragment des Transkriptionsfaktors Swi5 (AS 614 – 663 mit S646A) verwendet, da dieser Bereich von Swi5 bereits als NLS beschrieben ist (Moll *et al.*, 1991). Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob die Kernlokalisierung grundsätzlich für den Abbau in G1 notwendig ist und ob der Kernexport die Proteine vor ihrer Degradation schützen kann. Um dies zu überprüfen wurde neben der NLS eine Kernexportsequenz (NES) an Cdc5N80-GFP fusioniert. Als NES-Sequenz diente der C-terminale Bereich des Kernexportfaktors Nmd3 (AS 441 – 518), der für den Kernexport der großen ribosomalen Untereinheit verantwortlich ist (Gadal *et al.*, 2001). Zunächst wurden die Auswirkungen der NLS- und der NES-Fusion auf die Lokalisation der Fusionsproteine überprüft und als Zellkernmarker mCherry-NLS verwendet. GFP-NLS und die Cdc5N80-GFP-Derivate wurden dazu unter Induktion des *GALI*-Promotors für 60 min exprimiert und anschließend mikroskopiert.

Die NLS-Fusion an GFP hatte zur Folge, dass GFP-NLS verstärkt im Zellkern lokalisierte. GFP-NLS war wie GFP sowohl in der M-Phase als auch in der G1-Phase zu detektieren (Abb. 4.6 A). Da Cdc5N80-GFP bereits ausschließlich im Zellkern akkumulierte, war es nicht verwunderlich, dass auch Cdc5N80-GFP-NLS nur im Kern lokalisierte. Ebenso wie Cdc5N80-GFP, war auch kein Signal von Cdc5N80-GFP-NLS in G1 nachzuweisen (Abb. 4.6 B). Durch die Fusion der NLS-Sequenz an Cdc5N80db1/2-GFP akkumulierte Cdc5N80db1/2-GFP-NLS in mitotischen Zellen nun zum größten Teil im Zellkern und es konnte nur noch eine leichte zytoplasmatische Lokalisation detektiert werden. In G1-Zellen konnte kaum ein GFP-Signal von Cdc5N80db1/2-GFP-NLS nachgewiesen werden (Abb. 4.6 C). Durch die Fusion der NES-Sequenz an Cdc5N80-GFP akkumulierte Cdc5N80-GFP-NES größtenteils im Zytoplasma. Neben M-Phase-Zellen waren auch G1-Zellen mit Cdc5N80-GFP-NES-Signal zu sehen (Abb. 4.6 D).

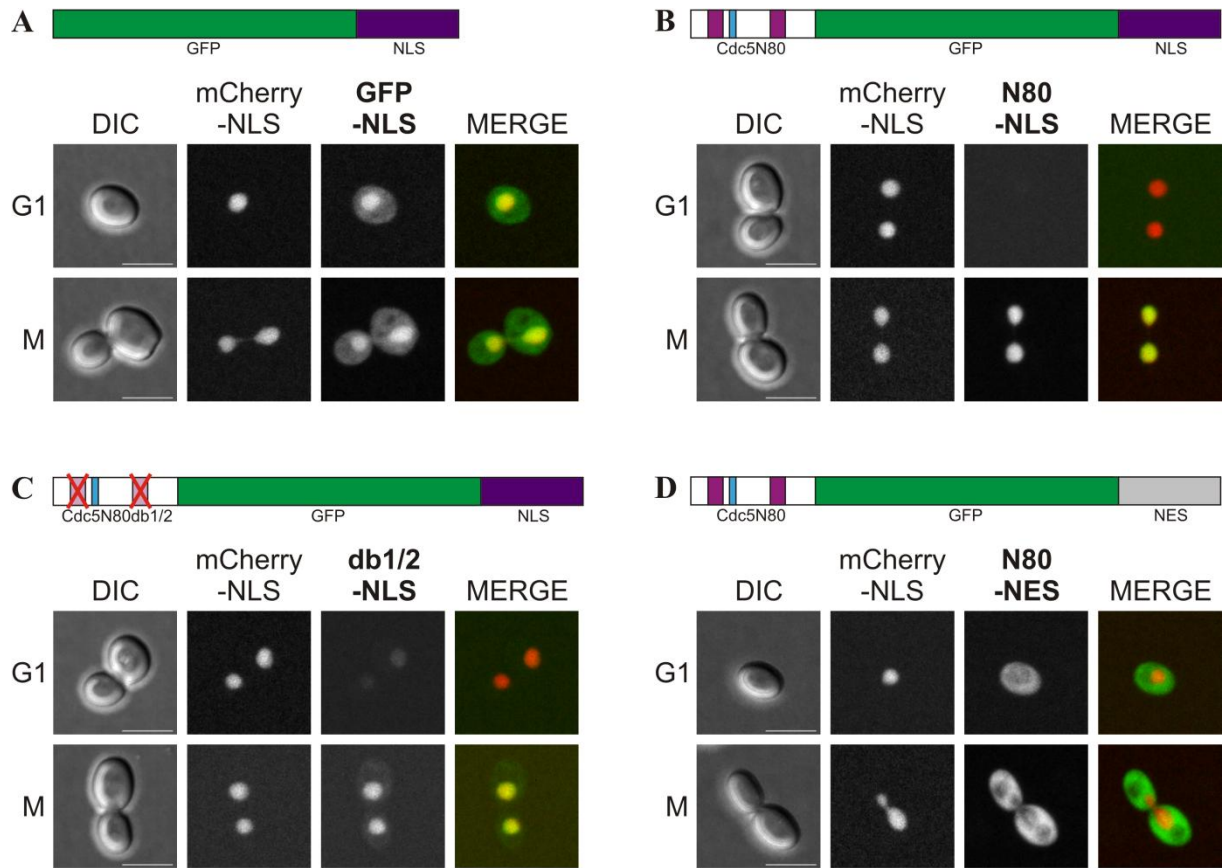


Abbildung 4.6 Cdc5N80db1/2-GFP-NLS lokalisiert hauptsächlich im Zellkern, Cdc5N80-GFP-NES dagegen im Zytoplasma

Die Zellen der Stämme (A) W12750 (*ura3::pGAL1-MYC3-GFP-NLS-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*), (B) W12632 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-NLS-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*), (C) W12633 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80db1/2-GFP-NLS-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*) und (D) W11443 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-NES-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*) wurden unter den gleichen Bedingungen, wie in Abb. 4.5 beschrieben, kultiviert, für die Mikroskopie präpariert und Z-Stapel aufgenommen. Cdc5N80-GFP-NLS und Cdc5N80db1/2-GFP-NLS wurde mit 5% des 488 nm Lasers, GFP-NLS und Cdc5N80-GFP-NES mit 20% des 488 nm Lasers und mCherry-NLS mit 15% des 561 nm Lasers detektiert. Die Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und für die jeweiligen Zellzyklusstadien repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 µm).

Als Nächstes wurde die Stabilität der Fusionsproteine in der G1-Phase untersucht. Wie unter 4.2.2, wurden die Zellen mit α -Faktor in der G1-Phase arretiert und anschließend die Expression induziert. Nach der Repression des *GAL1*-Promotors wurden die entsprechenden Zeitwerte geerntet und der Abbau der Proteine in der Westernblot-Analyse verfolgt. Außerdem wurde wie zuvor der vollständige G1-Arrest mittels Durchflusszytometrie überprüft (Abb. 4.7 A – D, 1C = G1-Phase).

Das Signal von GFP-NLS war wie GFP in der G1-Phase stabil und auch noch 75 min nach der Repression des *GALI*-Promotors zu detektieren (Abb. 4.7 A und E). Die Abnahme des Signals von Cdc5N80-GFP-NLS verlief genauso wie die von Cdc5N80-GFP. Nach 30 min konnte kein sichtbares Signal von Cdc5N80-GFP-NLS mehr detektiert werden (Abb. 4.7 B und E). Interessanterweise hatte die Fusion der NLS an Cdc5N80db1/2-GFP zur Folge, dass Cdc5N80db1/2-GFP-NLS bereits zu Beginn des Experiments nur noch schwach zu sehen und nach 45 min so gut wie verschwunden war (Abb. 4.7 C und E). Die Abbaukurven in Abbildung 4.7 G und die Quantifizierung der Expressionslevel in Abbildung 4.7 bzw. 4.4 F zeigen, dass der Abbau von Cdc5N80db1/2-GFP-NLS deutlich schneller als der von Cdc5N80db1/2-GFP verlief und dass bereits der Anfangslevel in G1 von Cdc5N80db1/2-GFP-NLS deutlich geringer war. Daraus lässt sich schließen, dass die Stabilisierung von Cdc5N80db1/2-GFP in G1 weitgehend auf die Fehllokalisation zurückzuführen ist.

Dennoch war die Abnahme von Cdc5N80db1/2-GFP-NLS immer noch etwas langsamer als die von Cdc5N80-GFP-NLS (Abb. 4.7 E). Dies lässt sich vermutlich anhand der immer noch bestehenden, aber geringen Unterschiede in der Lokalisation der beiden Fusionsproteine erklären (Abb. 4.6 B und C). Da Cdc5N80-GFP-NLS und GFP-NLS genauso instabil bzw. stabil wie Cdc5N80-GFP und GFP waren, kann ein möglicher Einfluss der fusionierten NLS auf den Abbau der Fusionsproteine ausgeschlossen werden.

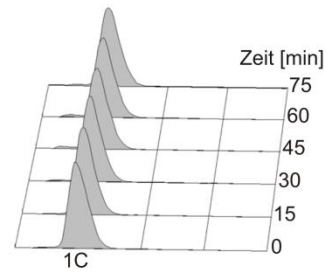
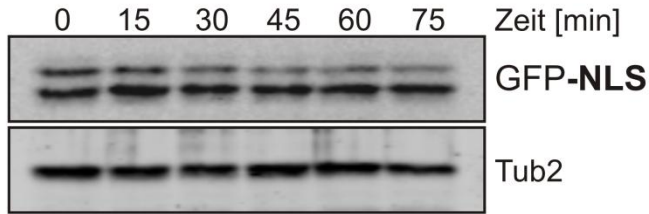
Die Fusion der NES-Sequenz an Cdc5N80-GFP hatte zur Folge, dass Cdc5N80-GFP-NES über die gesamte Dauer des Experiments gut nachzuweisen war (Abb. 4.7 D). Die Quantifizierung der Expressionslevel in asynchronen und G1-arretierten Zellen zeigte, dass Cdc5N80-GFP-NES im Gegensatz zu Cdc5N80-GFP-NLS deutlich stabilisiert war (Abb. 4.7 F). Dennoch konnte anhand der Abbaukurve eine Abnahme des Signals von Cdc5N80-GFP-NES festgestellt werden. Die Abnahme von Cdc5N80-GFP-NES war aber im Vergleich zu Cdc5N80-GFP deutlich geringer und zu Cdc5N80db1/2-GFP etwas geringer (vgl. Abb. 4.7 H und G). Da Cdc5N80-GFP-NES in Cdc5N80 ebenfalls eine NLS enthält, könnte dadurch eine Konkurrenz zwischen Kernimport und Kernexport entstanden sein. Möglicherweise ist der kurzfristige Kernimport für die Degradation von Cdc5N80-GFP-NES verantwortlich.

Zusammengenommen lassen die Ergebnisse aus der Mikroskopie und den Westernblot-Analysen annehmen, dass der Export aus dem Zellkern Cdc5N80-GFP stabilisiert und dass die Stabilität von Cdc5N80db1/2-GFP größtenteils auf der Fehllokalisation im Zytoplasma beruht. Das bedeutet, dass die D-Boxen im Fall von Cdc5 die Stabilität indirekt als Teil einer

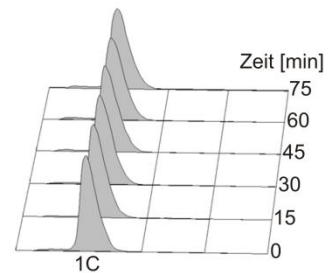
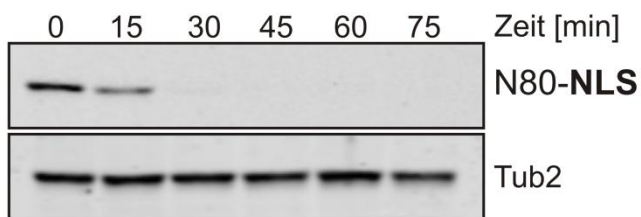
ERGEBNISSE

NLS beeinflussen und dass durch die Mutation der beiden RXXL-Sequenzen die NLS im N-terminalen Bereich von Cdc5 beeinträchtigt war.

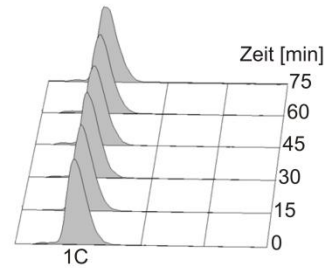
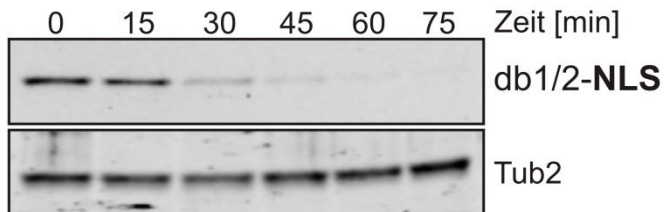
A



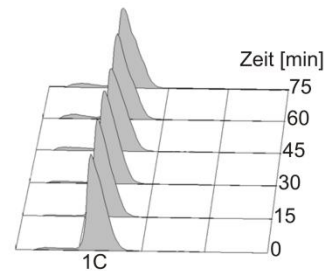
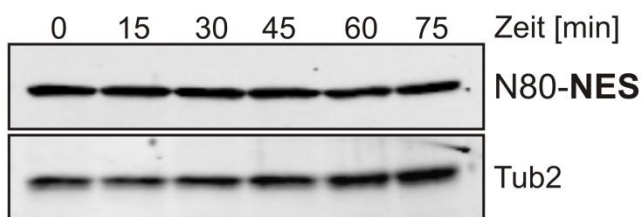
B



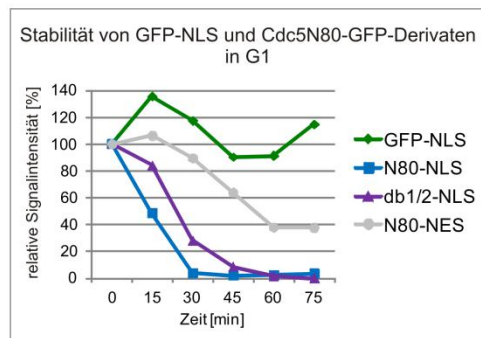
C



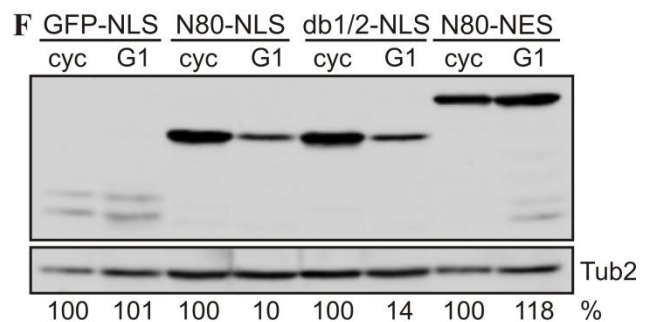
D



E



F



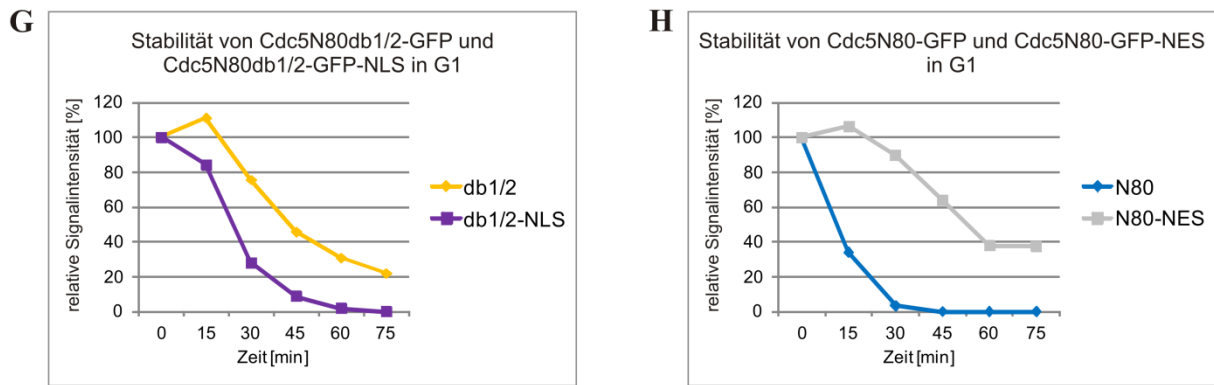


Abbildung 4.7 Kernlokalisierung ist notwendig für den Abbau von Cdc5N80-GFP in G1

Die Zellen der Stämme (A) W12234 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-GFP-NLS-tCYC1-URA3*), (B) W12608 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-NLS-tCYC1-URA3*), (C) W12609 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80db1/2-GFP-NLS-tCYC1-URA3*) und (D) W11546 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-NES-tCYC1-URA3*) wurden unter den gleichen Bedingungen angezogen, wie in Abb. 4.4 beschrieben. Das G1-Abbau-Experiment mit anschließender Westernblot-Analyse und Durchflusszytometrie (A – D), das Experiment zum Vergleich der Expressionslevel (F) sowie die Quantifizierung der Abbaukurven (E) und der Expressionslevel (F) wurden ebenfalls wie in Abb. 4.4 durchgeführt. Zum Vergleich der Abbaukurven von Cdc5N80db1/2-GFP und Cdc5N80db1/2-GFP-NLS (G) sowie von Cdc5N80-GFP und Cdc5N80-GFP-NES (H) wurden diese in zwei weiteren Diagrammen dargestellt.

4.2.4 Degradation von Cdc5N80-GFP ist im Nukleoplasma effektiver

Da sich gezeigt hat, dass neben den Degradationssignalen die Kernlokalisierung einen wichtigen Beitrag für den APC^{Hct1}-vermittelten Abbau von Cdc5N80-GFP in der G1-Phase leistet, war es von Interesse zu klären, ob auch die Lokalisation innerhalb des Nukleus einen Einfluss auf den Abbau haben könnte. Um dies zu testen, wurde Cdc5N80-GFP an Komponenten der Substrukturen des Zellkerns fusioniert. Zum einen an Chromatin, genauer gesagt an die Histone H2B und H1, und zum anderen an die Nukleolus-Komponente Hmo1. Wie zuvor wurde zuerst die Lokalisation der verschiedenen Fusionsproteine in den Substrukturen des Zellkerns überprüft. Als Zellkernmarker wurde mCherry-NLS, als Histonmarker H2A-yEmRFP und als Nukleolusmarker Nop56-3mCherry verwendet.

Die Mikroskopie-Daten der Histon-Fusionen zeigten zum einen, dass die Histone H2B und H1 unterschiedlich im Zellkern lokalisierten und zum anderen, dass die Fusionsproteine entsprechend den Histonen lokalisierten. Das Signal von Cdc5N80-GFP-H2B war deutlich kompakter als das von Cdc5N80-GFP-H1 und auch als das von mCherry-NLS, welches das Nukleoplasma widerspiegelt (Abb. 4.8 A und B, 1.Reihe). Das Gleiche galt auch für GFP-H2B und GFP-H1, die als Kontrollen dienten (Abb. 4.8 C und D). Außerdem co-

lokalisierte Cdc5N80-GFP-H2B exakt mit H2A-yEmRFP, wohingegen das Cdc5N80-GFP-H1-Signal weitflächiger war als das von H2A-yEmRFP (Abb. 4.8 A und B, 2.Reihe).

Die Mikroskopie-Daten der Nukleolus-Fusion zeigten, dass der größte Teil des Cdc5N80-GFP-Hmo1-Signals als die für den Nukleolus typische halbmondförmige Struktur vorlag. Außerdem co-lokalisierte es mit der Nukleolus-Komponente Nop56-3mCherry. Zusätzlich zu der Nukleolus-Lokalisation war Cdc5N80-GFP-Hmo1 leicht im Nukleoplasma zu detektieren (Abb. 4.8 E).

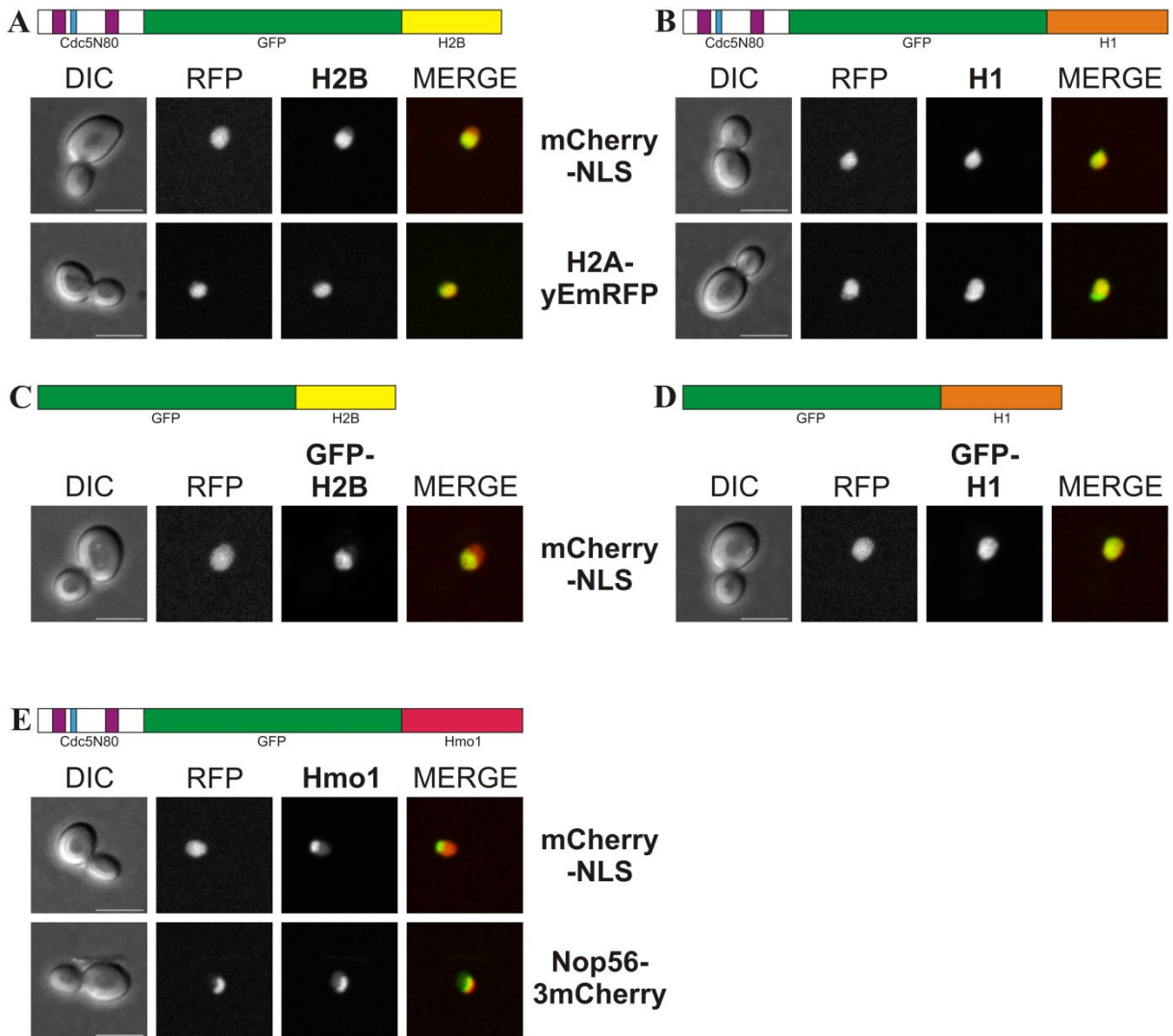


Abbildung 4.8 Co-Lokalisation von Cdc5N80-GFP-Derivaten mit Kern-, Histon- und Nukleolus-Markern
 Die Zellen der Stämme (A) W12364 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HTB1-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*) und W12246 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HTB1-tCYC1-URA3 HTA2-yEmRFP-HIS3MX6*), (B) W12365 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HHO1-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*) und W12247 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HHO1-tCYC1-URA3 HTA2-yEmRFP-HIS3MX6*) und (E) W11889 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HMO1-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*) und W11986 (*ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HMO1-tCYC1-URA3 NOP56-*

3mCherry-tCYC1-TRP1) wurden in XYR angezogen, der *GALI*-Promotor für 60 min mit 2% Galaktose in der exponentiellen Wachstumsphase bei 25°C induziert und anschließend für die Mikroskopie präpariert (SRG++-Agarose). Die Zellen der Stämme (C) W12406 (*ura3::pTEF2-GFP-HTB1-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*) und (D) W12407 (*ura3::pTEF2-GFP-HHO1-tCYC1-URA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase mit SD++-Agar für die Mikroskopie präpariert. Es wurden Z-Stapel bestehend aus 10 Ebenen mit einer Distanz von 0,5 µm und einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Cdc5N80-GFP-Derivate, GFP-H2B und GFP-H1 wurden mit 5% des 488 nm Lasers, mCherry-NLS und H2A-yEmRFP mit 15% und Nop56-3mCherry mit 10% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Axio Vision-Software projiziert und je eine repräsentative M-Phase-Zelle dargestellt (Maßstabsbalken = 5 µm).

Anschließend wurde wie zuvor die Instabilität der Histon- und des Nukleolus-Fusionsproteins in der G1-Phase überprüft. Die Westernblot-Analyse der beiden Histon-Fusionsproteine Cdc5N80-GFP-H2B und Cdc5N80-GFP-H1 zeigte, dass 30 min nach Repression des Promotors noch ein Signal detektiert werden konnte (Abb. 4.9 A und B), wohingegen zu diesem Zeitpunkt kein Cdc5N80-GFP-NLS-Signal mehr nachzuweisen war (Abb. 4.7 B). Daraus lässt sich schließen, dass Cdc5N80-GFP-H2B und Cdc5N80-GFP-H1 geringfügig stabilisiert gegenüber Cdc5N80-GFP-NLS waren. Die Stabilisierung durch die Fusion an H1 war etwas schwächer als die durch H2B. Trotz etwa gleicher Expressionslevel in asynchron gewachsenen Zellen (Abb. 4.9 E) war der 0-Wert von Cdc5N80-GFP-H1 etwas geringer als der von Cdc5N80-GFP-H2B (Quantifizierung nicht gezeigt) und die Bande nach 30 min war nur noch schwach zu sehen (Abb. 4.9 B). Die relative Abnahme der Signale war jedoch ziemlich ähnlich (Abb. 4.9 D). Der geringe Unterschied in der Stabilität der Histon-Fusionen könnte möglicherweise durch die unterschiedliche Zugänglichkeit aufgrund der Struktur der Nukleosomen erklärt werden, da H2B als Teil des Nukleosomen-Oktamers stärker kompaktiert wird als H1 (siehe Abb. 4.8 C und D).

Die Fusion von Cdc5N80-GFP an Hmo1 beeinflusste ebenfalls die Instabilität von Cdc5N80-GFP. Das Cdc5N80-GFP-Hmo1-Signal war 45 min nach der Repression des *GALI*-Promotors noch schwach zu detektieren (Abb. 4.9 C). Daraus lässt sich schließen, dass die Stabilisierung durch Hmo1 deutlicher ist als die durch die Histon-Fusionen. Dies zeigte auch die Quantifizierung der Signale. Die Abnahme von Cdc5N80-GFP-Hmo1 verlief etwas langsamer als die bei Cdc5N80-GFP-NLS und den Histon-Fusionen (Abb. 4.9 D).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass im Gegensatz zum Zytoplasma die Substrukturen des Zellkerns, wie der Nukleolus und das Chromatin für den APC^{Hct1} grundsätzlich zugänglich sind, aber den Abbau etwas verzögern.

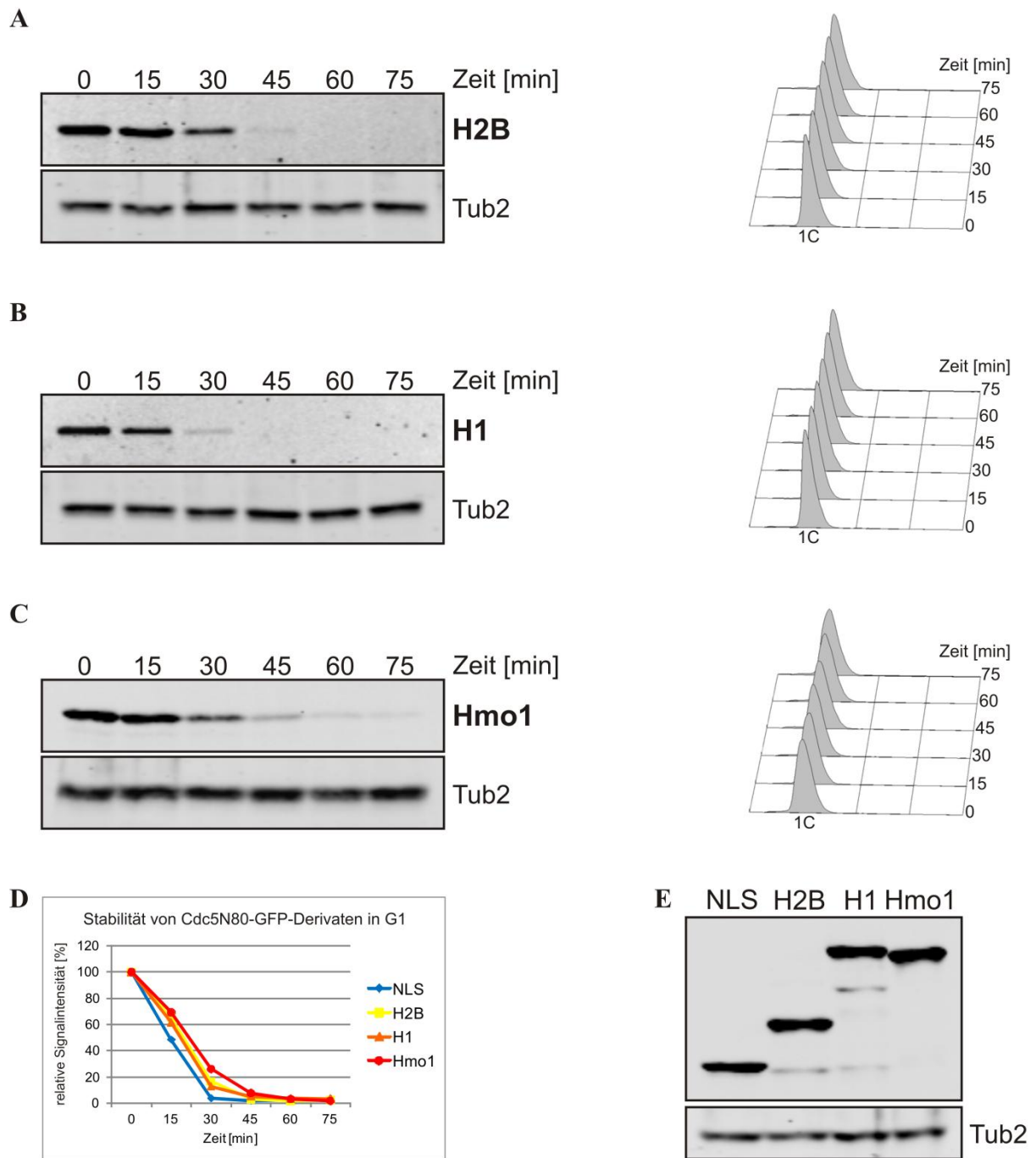


Abbildung 4.9 Lokalisation in Substrukturen des Zellkerns verzögert den Abbau in G1

Die Zellen der Stämme (A) W12235 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HTB1-tCYC1-URA3*), (B) W12236 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HHO1-tCYC1-URA3*) und (C) W11831 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HMO1-tCYC1-URA3*) wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert, wie in Abb. 4.4 beschrieben. Das G1-Abbau-Experiment mit anschließender Westernblot-Analyse und Durchflusszytometrie, die Quantifizierung der Abbaukurven (D) sowie der Vergleich der Expressionslevel von Cdc5N80-GFP-NLS und den Cdc5N80-GFP-Derivaten in asynchronen Zellen (E) wurden ebenfalls wie in Abb. 4.4 durchgeführt. Der Nachweis der Cdc5N80-GFP-Derivate erfolgte über ihr N-terminales MYC3-Epitop mit dem α -myc-Antikörper 9E10. Tubulin diente als Ladekontrolle und wurde mit dem α -Tub2-Serum nachgewiesen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Cdc5N80-GFP-Derivate, dass der N-terminale Bereich von Cdc5 nicht nur notwendig sondern auch hinreichend für die APC^{Hct1}-vermittelte Degradation ist. Die KEN-Box ist das entscheidende Degron in Cdc5 und die D-Boxen tragen als Teil einer NLS indirekt zur Instabilität bei. Neben der Erkennung des Abbausignals spielt auch die Lokalisation im Zellkern, genauer gesagt im Nukleoplasma, eine wichtige Rolle bei der Degradation in der G1-Phase.

4.3 Regulation von Cdc5 durch Cdk1-abhängige Phosphorylierung

Die Proteinsequenz von Cdc5 enthält fünf potentielle Cdk1-Phosphorylierungsstellen, wovon vier (T23, T70, T242 und S419) tatsächlich phosphoryliert werden und die Phosphorylierung von T242 für die Aktivität von Cdc5 essentiell ist (Mortensen *et al.*, 2005). Die gleichzeitige Mutation von T23A, T70A und S419A (pm1/2/4) beeinträchtigt ebenfalls die Funktionalität von Cdc5 (Arnold, 2008). Dies konnte anhand der unvollständigen Komplementation von *cdc5-Δ* durch *cdc5pm1/2/4* gezeigt werden, die sich anhand eines Wachstumsdefekts und einem gegenüber dem Wildtyp veränderten DNA-Profiles der Zellen ausdrückte. Die Komplementation von *cdc5-Δ* durch ein Wildtyp-Konstrukt (*CDC5*) war dagegen vollständig. Dies lässt vermuten, dass neben der Phosphorylierung von T242 auch weitere Phosphorylierungen für die Funktion von Cdc5 wichtig sind.

4.3.1 Komplementation von *cdc5-Δ* durch *cdc5pm1/2* ist unvollständig

Zunächst wurde überprüft, welche der drei Phosphorylierungsstellen (T23, T70, S419) für den phänotypischen Effekt verantwortlich ist und ob die 5. Phosphorylierungsstelle (S657) diesen Effekt weiter beeinflusst. Dazu wurden *CDC5*-Konstrukte mit unterschiedlichen Kombinationen der mutierten Phosphorylierungsstellen (pm) hergestellt, die unter der Kontrolle des endogenen Promotors (*pCDC5*) exprimiert wurden. Mit diesen Konstrukten wurde ein heterozygot diploider Stamm (*CDC5/cdc5-Δ*) transformiert und mit Hilfe der Tetradenanalyse die Fähigkeit der Phospho-Mutanten zur Komplementation von *cdc5-Δ* getestet. Lebensfähige Nachkommen wurden zusätzlich hinsichtlich ihres DNA-Profiles mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Im Vergleich zu *cdc5pm1/2/4* (Arnold, 2008) wurde der phänotypische Effekt durch die zusätzliche Mutation von S657A weder verstärkt noch geschwächt (Abb. 4.10 A). Die komplementierten Kolonien (K) bei *cdc5pm1/2/4/5* wuchsen wie im Fall von *cdc5pm1/2/4* etwas schlechter als WT-Kolonien. Auch das DNA-Profil zeigte eine starke Veränderung.

ERGEBNISSE

Anders als im WT war die Anzahl der Zellen in der G1- und der S-Phase deutlich reduziert und zusätzlich waren Zellen mit mehr als 2C-DNA-Gehalt vorhanden.

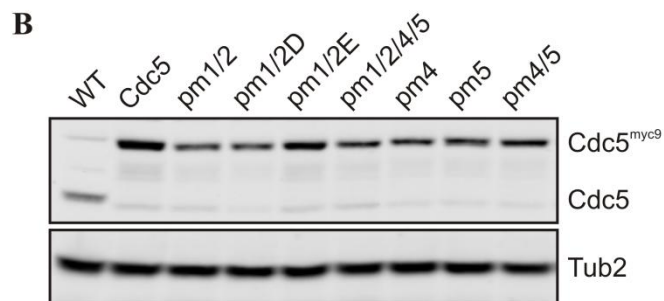
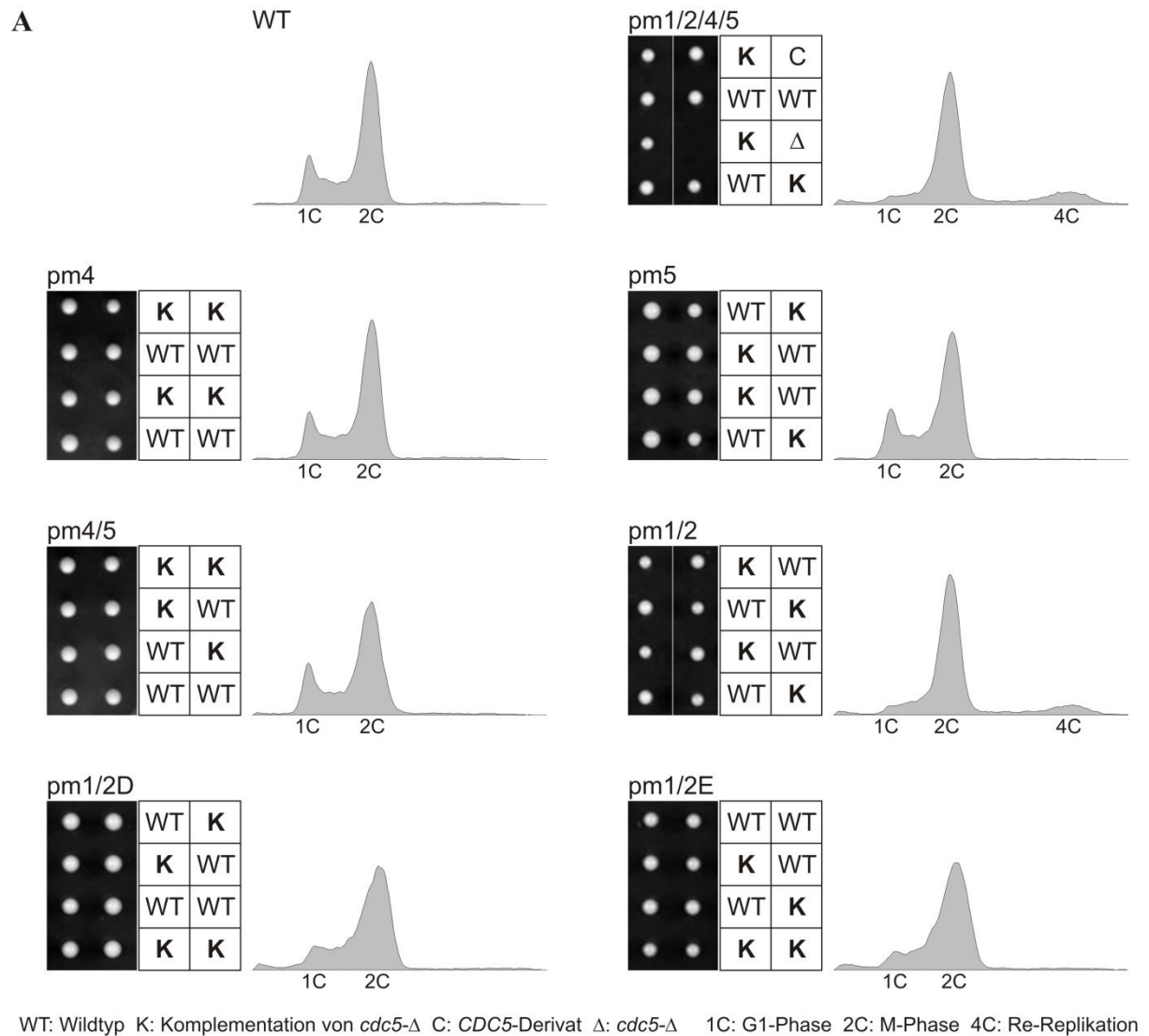


Abbildung 4.10 Komplementation von *cdc5-Δ* durch *cdc5pm*-Derivate

(A) Der Stamm W2015 (*CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6*) wurde mit den Plasmiden pWS2718, pWS2715, pWS2717, pWS2719, pWS2716, pWS2944 und pWS2946 (siehe Tab. 7.2) transformiert. Anschließend wurden die daraus resultierenden heterozygot diploiden Stämme W8098 (*CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2/leu2::pCDC5-cdc5pm1/2/4/5-MYC9-LEU2*), W8099 (*CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2/leu2::pCDC5-cdc5pm4-MYC9-LEU2*),

W8100 (*CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2/leu2::pCDC5-cdc5pm5-MYC9-LEU2*), W8101 (*CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2/leu2::pCDC5-cdc5pm4/5-MYC9-LEU2*), W8097 (*CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2/leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9-LEU2*), W8492 (*CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2/leu2::pCDC5-cdc5pm1/2D-MYC9-LEU2*) und W8493 (*CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2/leu2::pCDC5-cdc5pm1/2E-MYC9-LEU2*) einer Tetradenanalyse unterzogen und die Nachkommen auf ihren Genotyp hin untersucht. Zusätzlich wurde der DNA-Gehalt des WT-Stammes K699 und der haploiden Nachkommen W8186 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2/4/5-MYC9-LEU2*), W8180 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm4-MYC9-LEU2*), W8182 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm5-MYC9-LEU2*), W8184 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm4/5-MYC9-LEU2*), W8176 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9-LEU2*), W8622 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2D-MYC9-LEU2*) und W8624 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2E-MYC9-LEU2*) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurden die Zellen in XYD bei 25°C kultiviert und in ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit 70% Ethanol fixiert. Anschließend wurde die DNA mittels Sytox Green gefärbt.

(B) Für den Vergleich der Expressionslevel mittels Westernblot-Analyse wurden die haploiden Nachkommen sowie die Stämme W9763 (WT) und W6856 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-CDC5-MYC9-LEU2*) in XYD bei 25°C angezogen, in ihrer exponentiellen Wachstumsphase geerntet und aufgearbeitet. Der Nachweis von endogenem Cdc5 und der Cdc5-Derivate erfolgte durch das α -Cdc5-Serum. Tubulin (Tub2) diente als Ladekontrolle und wurde anhand des α -Tub2-Serums detektiert.

Der phänotypische Effekt konnte bei *cdc5pm4*, *cdc5pm5* und *cdc5pm4/5* nicht festgestellt werden. Deren Wachstum und DNA-Profil verhielten sich wie bei der Komplementation von *cdc5-Δ* durch *CDC5* bzw. wie Wildtyp (Abb. 4.10 A; Arnold, 2008). Dagegen war die Komplementation von *cdc5-Δ* durch *cdc5pm1/2* immer noch beeinträchtigt. Dies zeigte sich erneut durch kleinere Kolonien in der Tetradenanalyse und durch ein verändertes DNA-Profil, das vergleichbar wie das von *cdc5pm1/2/4/5* war (Abb. 4.10 A). Um zu überprüfen, ob tatsächlich die fehlenden Phosphorylierungen der Grund für den Defekt der *cdc5pm1/2*-Mutante sein könnten, wurden Mutanten hergestellt, die die Phosphorylierungen imitierten. Dazu wurden T23 und T70 jeweils zu Aspartat (*cdc5pm1/2D*) und Glutamat (*cdc5pm1/2E*) ausgetauscht. Die Tetradenanalyse der Phospho-imitierenden Mutanten zeigte, dass bei der Komplementation von *cdc5-Δ* durch *cdc5pm1/2D* bzw. *cdc5pm1/2E* das Wachstum der komplementierten Kolonien nicht beeinflusst war. Das DNA-Profil zeigte weniger starke Effekte als im Fall von *cdc5pm1/2*. Zwar waren weniger Zellen mit nicht-replizierter DNA zu sehen, aber keine Zellen mit re-replizierter DNA (Abb. 4.10 A). Daraus lässt sich schließen, dass die Mutation der N-terminalen Phosphorylierungsstellen für den phänotypischen Effekt der *cdc5pm1/2*-Mutante verantwortlich ist und dass deren Phosphorylierung für die Funktion von Cdc5 wichtig zu sein scheint.

Um sicher zu stellen, dass der beobachtete Effekt nicht durch Unterschiede bezüglich der Expressionslevel zu Stande kam, wurden die Proteinmengen von endogenem Cdc5, des Wildtyp-Konstrukts Cdc5 und der Phospho-Mutanten mittels Westernblot-Analyse überprüft. Die Abbildung 4.10 B zeigt, dass die Expressionslevel der Phospho-Mutanten relativ ähnlich waren, jedoch etwas geringer als der des Wildtyp-Konstrukts Cdc5. Da allerdings die Proteinmengen aller Cdc5-Derivate höher als die des endogenen Cdc5 (WT) waren, kann angenommen werden, dass der phänotypische Effekt bei der Komplementation von *cdc5-Δ* nicht auf zu geringer Expression, sondern auf den Mutationen beruht.

Als Nächstes wurde die Komplementation von *cdc5-Δ* durch endogene Mengen von *cdc5pm1/2* überprüft. Um die Einfachintegration von DNA-Konstrukten zu erzeugen, wurden bei der Hefetransformation spezielle integrative Plasmide und ein zweifaches Selektionsverfahren eingesetzt (siehe 6.2.7.2). Die daraus resultierenden Stämme wurden anschließend mit einem WT-Stamm gekreuzt und zur Sporulation gebracht. Anhand der vereinzelt Sporen nach der Tetradenanalyse ließ sich das Wachstum der durch endogene Mengen komplementierten Zellen beobachten. Zudem wurde wieder eine Analyse des DNA-Profiles mittels Durchflusszytometrie und der Expressionslevel mittels Westernblot-Analyse durchgeführt.

Die Tetradenanalyse zeigte, dass das Wildtyp-Konstrukt *CDC5* auch bei endogenen Mengen in der Lage war, *cdc5-Δ* zu komplementieren. Die komplementierten Sporen (K) wuchsen wie WT. Allerdings zeigte sich anhand der DNA-Profile eine leichte Beeinträchtigung der Zellen. Der 1C-Peak war etwas kleiner als der des WT (Abb. 4.11 A). Der entstandene Wachstumsdefekt bei der Komplementation von *cdc5-Δ* durch *cdc5pm1/2* war anhand der komplementierten Sporen mit endogener Cdc5pm1/2-Menge nun noch deutlicher zu sehen, da die komplementierten Sporen deutlich langsamer als WT-Zellen wuchsen. Dieses Ergebnis wurde auch durch die DNA-Profile bestätigt. Der 1C-Peak von in Glukose gewachsenen *cdc5pm1/2*-Zellen war nicht mehr zu sehen und in Raffinose gewachsenen Zellen sehr stark reduziert. In beiden Fällen war erneut ein Peak größer als 2C zu sehen (Abb. 4.11 A). Die Komplementation von *cdc5-Δ* durch *cdc5pm1/2D* nach endogener Expression war ähnlich wie die von *CDC5*. Das Wachstum der Sporen aus der Tetradenanalyse war kaum beeinträchtigt. Allerdings wiesen die DNA-Profile, vor allem das der in Raffinose gewachsenen Zellen, eine leichte Reduzierung des 1C-Peaks auf. Die Analyse der Expressionslevel mittels Westernblot zeigte, dass die Expression der Cdc5-Derivate vergleichbar mit der des endogenen Cdc5 (WT) waren (Abb. 4.11 B).

ERGEBNISSE

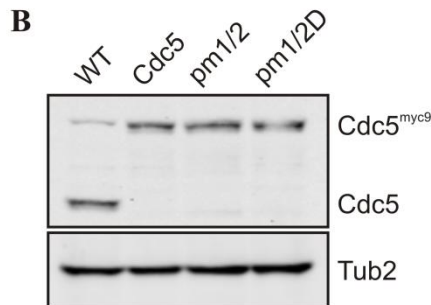
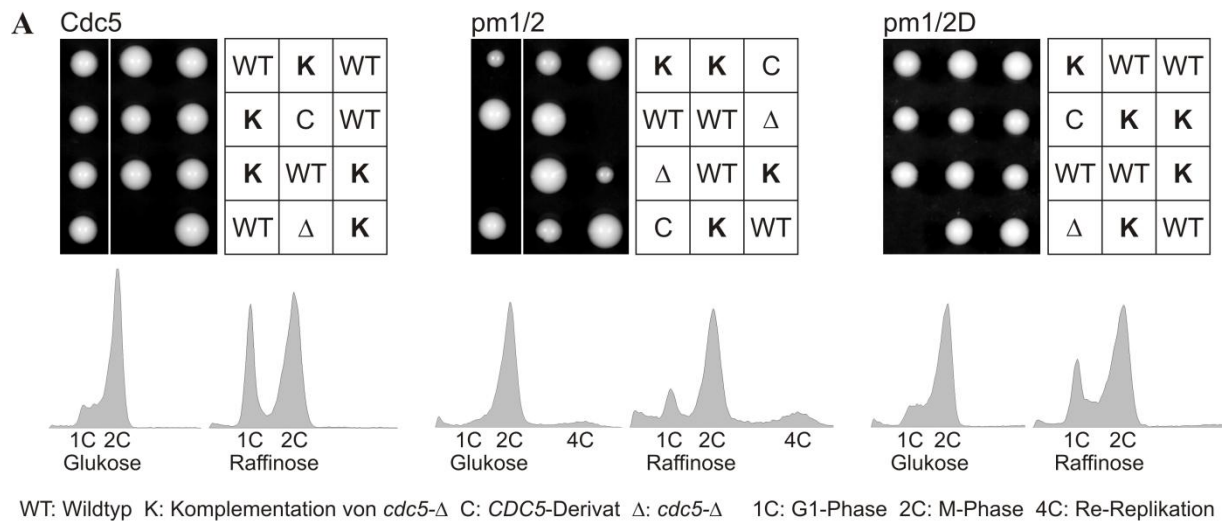


Abbildung 4.11 Komplementation von *cdc5-Δ* durch endogene Mengen der *CDC5*-Derivate

Zur Herstellung der Stämme mit Einfachintegration wurde der Stamm W2015 (*CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6*) mit den *disintegrator* Plasmiden pWS2821, pWS2826 und pWS2976 (siehe Tab. 7.2) transformiert. Die aus der Tetradenanalyse resultierenden Nachkommen wurden zunächst zur erneuten homologen Rekombination auf XYD kultiviert und anschließend der Selektion auf 5-FOA-Platten unterzogen. Zur Identifizierung der Stämme mit Einfachintegration wurden die positiven Klone auf XYD, SD-H, SD-MET und SD-U ausgestrichen.

(A) Um das Wachstum der komplementierten Stämme mit Einfachintegration zu testen, wurden die Stämme W8393 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9*), W8395 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9*) und W8626 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2D-MYC9*) mit dem Stamm W9763 (WT) gekreuzt, danach eine Tetradenanalyse durchgeführt und die haploiden Nachkommen auf ihren Genotyp hin untersucht. Um die DNA-Profile zu vergleichen, wurden die Zellen der Stämme W8394, W8396 und W8627 in XYD und XYR bei 25°C kultiviert und in ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit 70% Ethanol fixiert. Die DNA der fixierten Zellen wurden mit Sytox Green gefärbt und der DNA-Gehalt mittels Durchflusszytometrie gemessen.

(B) Für den Vergleich der Expressionslevel mittels Westernblot-Analyse wurden die Stämme W9763, W10318 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9*), W10319 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9*) und W10413 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2D-MYC9*) in XYD bei 25°C kultiviert, in ihrer exponentiellen Wachstumsphase geerntet und aufgearbeitet. Der Nachweis von endogenem Cdc5 und der Cdc5-Derivate erfolgte durch das α-Cdc5-Serum. Tubulin (Tub2) diente als Ladekontrolle und wurde anhand des α-Tub2-Serums detektiert.

Die Ergebnisse der Komplementation von *cdc5-Δ* durch endogene Expression von *cdc5pm1/2* bestätigen die Vermutung, dass die beiden N-terminalen Phosphorylierungen für die Funktion von Cdc5 bedeutend sein könnten.

4.3.2 Mutation der N-terminalen Phosphorylierungsstellen hat keinen Einfluss auf die Instabilität von Cdc5

Um die Funktion der N-terminalen Phosphorylierung von Cdc5 zu identifizieren, wurde zunächst deren Einfluss auf die Instabilität von Cdc5 getestet, da der N-terminale Bereich von Cdc5 dessen Instabilität vermittelt (siehe 4.1 und 4.2; Shirayama *et al.*, 1998). Dazu wurde das Fusionsprotein Cdc5N80pm1/2-GFP durch Fusion der 80 N-terminalen Aminosäuren von Cdc5pm1/2 an GFP erzeugt und das DNA-Konstrukt unter die Kontrolle des *GALI*-Promotors gestellt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Mutation der Phosphorylierungsstellen in der G1-Phase keinen Einfluss auf die Instabilität von Cdc5N80-GFP hatten (Gaub, 2010). Da die Phosphorylierung der N-terminalen Domäne vermutlich Cdk1 abhängig ist und die Cdk1-Aktivität in der G1-Phase gering ist (Enserink und Kolodner, 2010), wurde die Stabilität von Cdc5N80-GFP und Cdc5N80pm1/2-GFP nun bei hoher Cdk1-Aktivität in der M-Phase überprüft. Dazu wurden die Zellen zuerst durch Zugabe des Paarungspheromons α -Faktor in der G1-Phase synchronisiert und anschließend durch Zugabe von Nocodazol in den M-Phase-Arrest entlassen. Beim Entlassen der Zellen aus der G1-Phase wurde zusätzlich die Expression der Fusionsproteine für 30 min induziert. Nach der Repression des Promotors wurden Proben für die Westernblot-Analyse geerntet, um die Proteinlevel zu verfolgen. Zusätzlich wurden während des gesamten Experiments Proben für die Durchflusszytometrie genommen, um die Synchronität der Zellen und den Arrest in der M-Phase zu überprüfen.

Die DNA-Profile in Abbildung 4.12 A und B zeigen, dass die Zellen in beiden Fällen zuerst vollständig in der G1-Phase arretierten (α) und 30 min nach der Repression des Promotors die M-Phase erreichten. Der M-Phase-Arrest wurde über die weitere Dauer des Experiments aufrecht erhalten. Im Gegensatz zur G1-Phase war Cdc5N80-GFP in der M-Phase stabil. Die Expression von Cdc5N80-GFP stieg bis 30 min nach Beendigung der Transkription weiter an. Auch nach 150 min konnte immer noch ein starkes Signal detektiert werden (Abb. 4.12 A). Gleiches galt auch für die Phospho-Mutante Cdc5N80pm1/2-GFP. Anfangs nahm das Signal zu (30 min) und blieb dann über die Dauer des Experiments konstant (Abb. 4.12 B).

Daraus und aus der Tatsache, dass die benachbarten RXXL-Sequenzen indirekt als Teil einer NLS zur Instabilität von Cdc5 beitragen (siehe 4.2), lässt sich schließen, dass die

Phosphorylierungen im N-terminalen Bereich keinen Einfluss auf die Instabilität von Cdc5 haben.

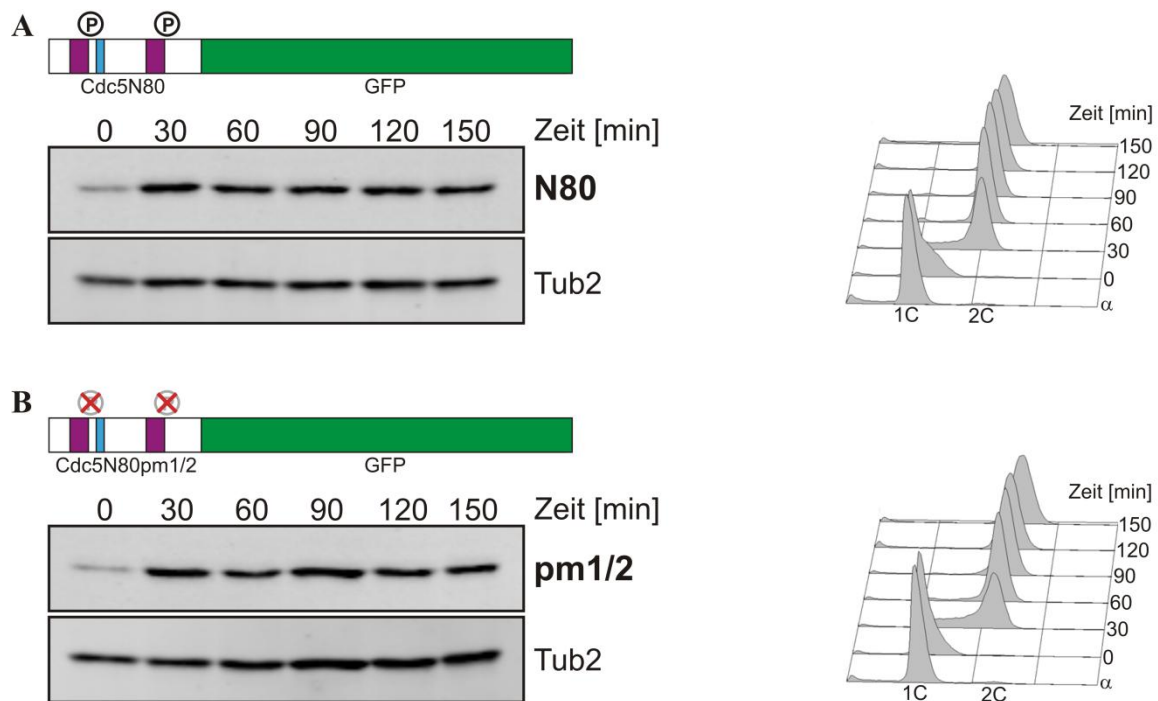


Abbildung 4.12 Instabilität von Cdc5N80pm1/2-GFP in der M-Phase

Die Zellen der Stämme (A) W9250 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-tCYC1-URA3*) und (B) W9703 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80pm1/2-GFP-tCYC1-URA3*) wurden in XYR bei 25°C angezogen und durch Zugabe des Paarungspheromons α -Faktor (50 ng/ml) während der exponentiellen Wachstumsphase in G1 arretiert. Nach 3 h Arrest wurden 0,25 OD₆₀₀ Zellen für die Durchflusszytometrie mit 70% Ethanol fixiert, die restlichen Zellen in XYR mit Nocodazol (7,5 μ g/ml) umgesetzt, der *GAL1*-Promotor für 30 min induziert und danach der 0-Wert geerntet. Dann wurden die übrigen Zellen in XYD mit Nocodazol (7,5 μ g/ml) umgesetzt, um den Promotor wieder zu reprimieren. Es wurden Proben 30, 60, 90, 120 und 150 min nach der Repression des *GAL1*-Promotors für die Westernblot-Analyse sowie die Durchflusszytometrie geerntet und aufgearbeitet. In der Westernblot-Analyse wurden die Cdc5N80-GFP-Derivate über ihr N-terminales MYC3-Epitop mit dem α -myc-Antikörper 9E10 und Tubulin (Tub2) mittels α -Tub2-Serum nachgewiesen. Tubulin diente dabei als Ladekontrolle. Anhand der Durchflusszytometrie wurde der DNA-Gehalt der Zellen gemessen und der vollständige Arrest in der G1- und der M-Phase überprüft (1C = G1-Phase, 2C = M-Phase).

4.3.3 Mutation der N-terminalen Phosphorylierungsstellen hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Cdc5

Als Nächstes wurde der Einfluss der N-terminalen Phosphorylierung auf die Lokalisation von Cdc5 überprüft, da der N-terminale Bereich von Cdc5 zur Lokalisation im Zellkern beiträgt (siehe 4.2). Dazu wurde die Lokalisation von GFP-fusioniertem endogenem Cdc5 (eCdc5-

ERGEBNISSE

GFP) und von Cdc5-GFP-Derivaten am konfokalen Mikroskop untersucht. Zur Visualisierung der SPK wurde die SPK-Komponente Spc42 mit einer C-terminalen 3mCherry-Fusion verwendet.

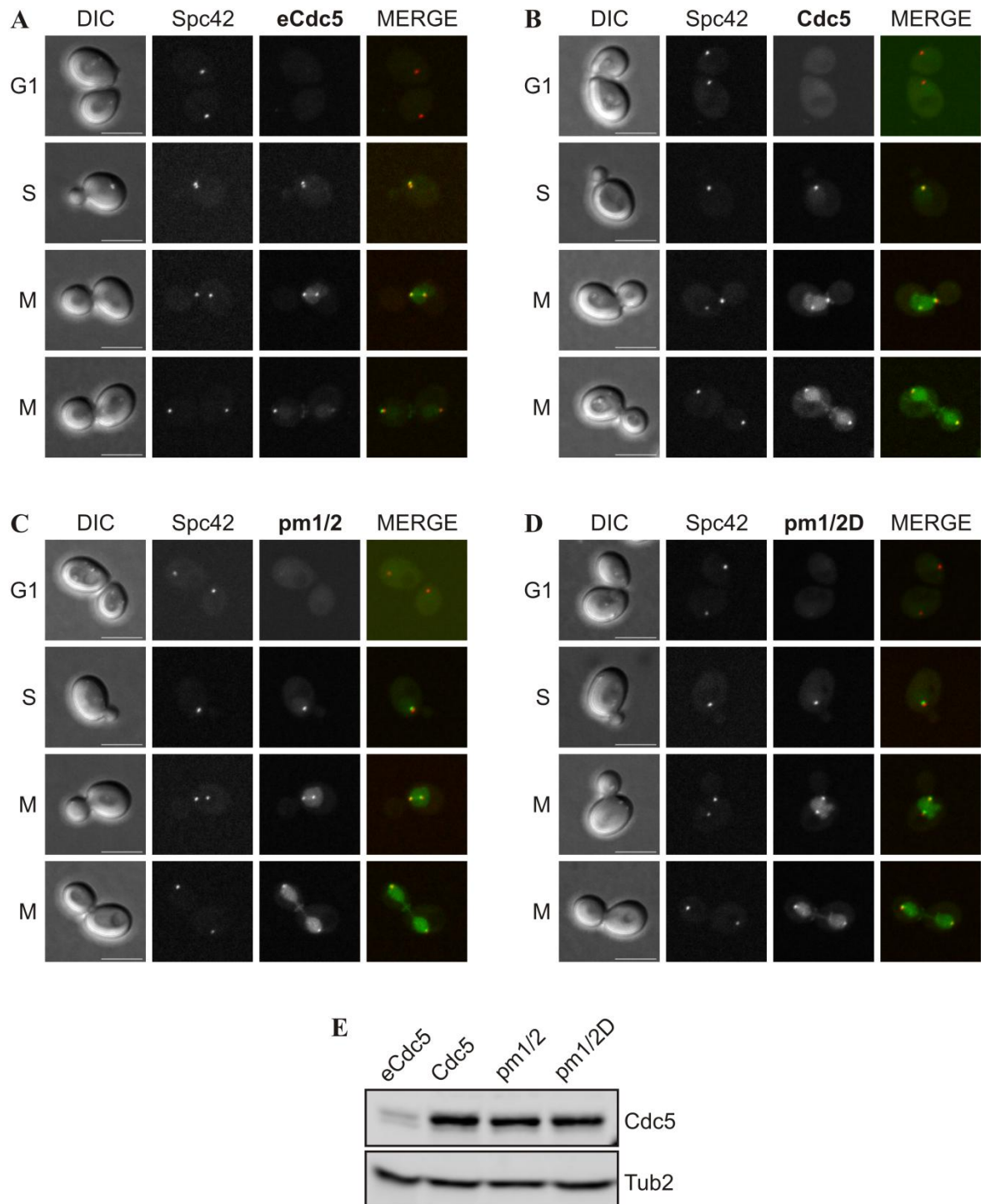


Abbildung 4.13 Lokalisation der Cdc5-GFP-Derivate während des Zellteilungszyklus

Die Zellen der Stämme (A) W10353 (*CDC5-GFP-CaURA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*), (B) W10787 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-CDC5-GFP-tADH1-LEU2 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*), (C) W10788 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-GFP-tADH1-LEU2 trp1::pSPC42-SPC42-*

3mCherry-tCYC1-TRP1) und (D) W10789 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2D-GFP-tADH1-LEU2 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Anschließend wurden die Zellen mit SD++-Agarose für die Mikroskopie präpariert. Es wurden Z-Stapel aus 10 Ebenen mit einer Distanz von je 0,5 µm und einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Endogenes Cdc5-GFP wurde mit 40% und Cdc5-GFP-Derivate mit 20% des 488 nm Lasers sowie Spc42-3mCherry mit 75% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und für die jeweiligen Zellzyklusstadien repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 µm).

Für den Vergleich der Expressionslevel mittels Westernblot-Analyse (E) wurden die Stämme W10425 (*CDC5-GFP-CaURA3*), W10653 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-CDC5-GFP-tADH1-LEU2*), W10657 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-GFP-tADH1-LEU2*) und W10661 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2D-GFP-tADH1-LEU2*) in XYD bei 25°C angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und aufgearbeitet. Der Nachweis von endogenem Cdc5-GFP und der Cdc5-GFP-Derivate erfolgte durch das α-Cdc5-Serum. Tubulin (Tub2) diente als Ladekontrolle und wurde anhand des α-Tub2-Serums detektiert.

In Abbildung 4.13 ist die Lokalisation von eCdc5-GFP und den Cdc5-GFP-Derivaten während des Zellteilungszyklus gezeigt. In der G1-Phase konnte weder eCdc5-GFP noch eines der Cdc5-GFP-Derivate detektiert werden, da Cdc5 in der G1-Phase instabil ist. Während des Zellzyklus war eCdc5-GFP ab dem Beginn der S-Phase am SPK zu sehen. In der frühen M-Phase wurde eCdc5-GFP zusätzlich im Zellkern sichtbar und in der späten M-Phase meist auch am Knospenhals (Abb. 4.13 A). Die Lokalisation von Cdc5-GFP, Cdc5pm1/2-GFP und Cdc5pm1/2D-GFP unterschied sich nicht von der des eCdc5-GFP (Abb. 4.13 A – D). Die Cdc5-GFP-Derivate waren ebenfalls phasenspezifisch am SPK, im Zellkern und am Knospenhals zu detektieren. Da das Signal von eCdc5-GFP relativ schwach war, wurde bei den Cdc5-GFP-Derivaten eine stärkere Expression gewählt, die anhand der Westernblot-Analyse ermittelt wurde (Abb. 4.13 E).

Die Ergebnisse der Mikroskopie-Daten zeigen, dass die Mutation der N-terminalen Cdk1-Phosphorylierungsstellen die Lokalisation von Cdc5 nicht beeinflusst.

4.3.4 Genetische Interaktionen von *cdc5mp1/2*

Da weder ein Einfluss der Phosphorylierungen im N-terminalen Bereich auf die Stabilität noch auf die Lokalisation von Cdc5 gezeigt werden konnte, wurde als Nächstes die Ursache des beobachteten Phänotyps der *cdc5pm1/2*-Mutante anhand von genetischen Interaktionsstudien analysiert.

4.3.4.1 Synthetische Letalität von *cdc5pm1/2* mit *clb2-Δ* und *CDC14^{HA10}*

Cdc5 und Cdk1 sind wichtige Regulatoren des Zellzyklus und beeinflussen sich gegenseitig in der Aktivität. Cdk1 aktiviert nicht nur Cdc5, sondern phosphoryliert Cdc5-Substrate, wodurch die Bindung der Substrate durch Cdc5 erleichtert wird. Cdc5 ist sowohl an der Aktivierung der Cdk1 als auch an deren Inaktivierung beim Austritt aus der Mitose beteiligt (Lee *et al.*, 2005b; Mortensen *et al.*, 2005; Archambault und Glover, 2009). Um die genetische Interaktion von *cdc5pm1/2* mit *clb2-Δ* zu untersuchen, wurden die Mutanten durch Kreuzung kombiniert und die Lebensfähigkeit der Doppelmutante *clb2-Δ cdc5pm1/2* anhand einer Tetradenanalyse überprüft.

Die Abbildung 4.14 zeigt, dass die *clb2-Δ* Mutante (2) geringfügig schlechter wuchs als Wildtyp-Zellen, wohingegen *cdc5-Δ CDC5*-Zellen (K) im Wachstum nicht eingeschränkt waren. Die Doppelmutante *clb2-Δ cdc5-Δ CDC5* (D) war lebensfähig, aber wuchs noch schlechter als die Einzelmutter *clb2-Δ*. Der Phänotyp von *cdc5-Δ cdc5pm1/2* wurde durch *clb2-Δ* noch weiter verstärkt. Die Doppelmutante *clb2-Δ cdc5-Δ cdc5pm1/2* war nicht mehr lebensfähig (Abb. 4.14 rechts).

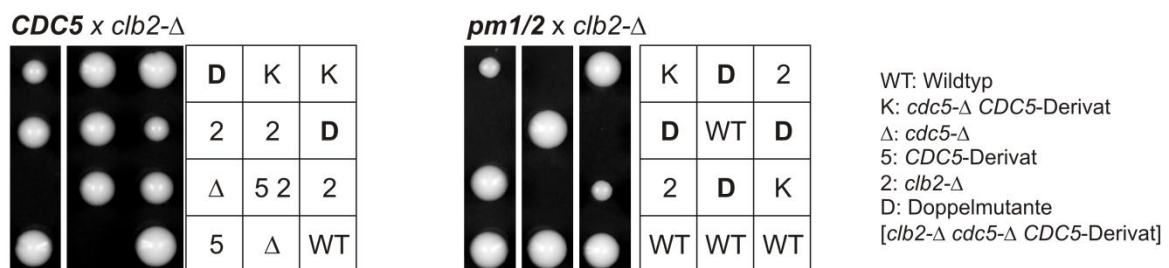


Abbildung 4.14 Genetische Interaktion von *cdc5pm1/2* mit *clb2-Δ*

Die Stämme W8394 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9*) und W8396 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9*) wurden mit dem Stamm K1890 (*clb2-Δ::LEU2*) gekreuzt und anschließend einer Tetradenanalyse unterzogen. Die haploiden Nachkommen wurden auf einer XYD-Platte vereinzelt und auf ihren Genotyp hin untersucht.

Eine weitere wichtige Funktion von Cdc5 als Bestandteil der Signalwege FEAR und MEN am Ende der Mitose ist es, Cdc14 zu aktivieren. Außerdem ist bekannt, dass beeinträchtigtes Cdc14 synthetisch letal mit *cdc5-1* Mutanten und auch *clb2-Δ* Mutanten ist (Jaspersen *et al.*, 1998; Yuste-Rojas und Cross, 2000; Rahal und Amon, 2008). Cdc14^{HA10} ist funktionell beeinträchtigt (Geil, 2008) und wurde verwendet, um die genetische Interaktion von *cdc5-Δ cdc5pm1/2* mit einer *cdc14*-Mutante zu testen.

CDC14^{HA10} (14) hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen (Abb. 4.15). Die Doppelmutante *CDC14^{HA10} cdc5-Δ CDC5* (D) wuchs zunehmend wie die

CDC14^{HA10}-Zellen und WT. Dagegen war auch in diesem Fall die Doppelmutante *CDC14^{HA10} cdc5-Δ cdc5pm1/2* synthetisch letal (Abb. 4.15 rechts).

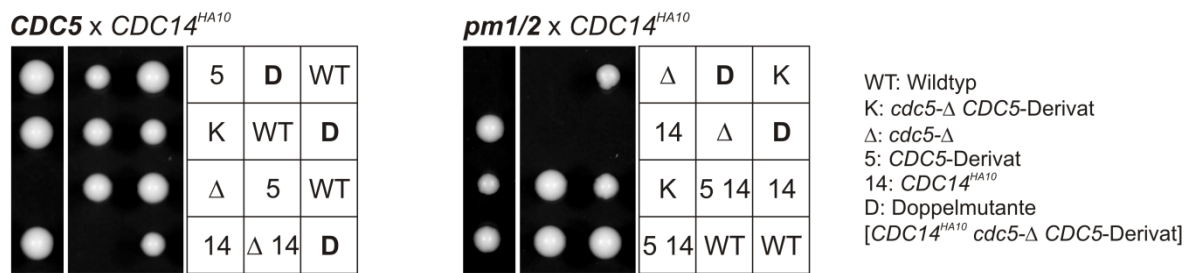


Abbildung 4.15 Genetische Interaktion von *cdc5pm1/2* und *CDC14^{HA10}*

Die Stämme W8393 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9*) und W8395 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9*) wurden mit dem Stamm W4754 (*CDC14-HA10-LEU2*) gekreuzt und anschließend einer Tetradenanalyse unterzogen. Die haploiden Nachkommen wurden auf einer XYD-Platte vereinzelt und auf ihren Genotyp hin untersucht.

Auch wenn kein Einfluss auf die Stabilität und die Lokalisation beobachtet werden konnte, lässt sich aufgrund der synthetischen Letalität von *cdc5pm1/2* mit *clb2-Δ* und *CDC14^{HA10}* annehmen, dass die N-terminalen Phosphorylierungen sehr wohl einen Einfluss auf die biologische Funktion von Cdc5 haben.

4.3.4.2 Überexpression von Cdc14 supprimiert den *cdc5pm1/2*-Phänotyp

Eine mögliche Erklärung des Phänotyps der *cdc5pm1/2*-Mutante könnte eine verminderte Aktivierung von Cdc14 am Ende der Mitose sein. Da bekannt ist, dass erhöhte Mengen an Cdc14 das Wachstum der *cdc5-1* Mutante bei 37°C verbessern (Jaspersen *et al.*, 1998), wurde die Auswirkung von erhöhten Mengen an Cdc14 in der *cdc5pm1/2*-Mutante überprüft. Dazu wurde das Wachstum mittels Tetradenanalyse und anschließendem Wachstumstest sowie das DNA-Profil der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Die Tetradenanalyse zeigte, dass erhöhte Mengen an Cdc14 (14) keinen Einfluss auf das Wachstum von WT-Zellen hatten (Abb. 4.16 A). Auch die durch *CDC5* komplementierten *cdc5-Δ* Zellen wuchsen mit erhöhten Mengen an Cdc14 (D) wie WT (Abb. 4.16 A links). Interessanterweise wuchsen auch *cdc5-Δ cdc5pm1/2*-Zellen wieder fast wie WT, wenn sie mehr Cdc14 exprimierten (D, Abb. 4.16 A rechts).

Dieses Ergebnis wurde durch den Vergleich des Wachstums von *cdc5-Δ cdc5pm1/2*-Stämmen mit endogenen Mengen und erhöhten Mengen von Cdc14 verdeutlicht. In Abbildung 4.16 B ist gezeigt, dass bei niedrigen Temperaturen sowohl *cdc5pm1/2*-Mutanten als auch *cdc5-1* Mutanten durch höheren Cdc14-Level zunehmend wie WT-Zellen wuchsen. Bei 37°C konnte

das verbesserte Wachstum ebenfalls beobachtet werden, allerdings wuchsen die Zellen deutlich schlechter als bei niedrigeren Temperaturen.

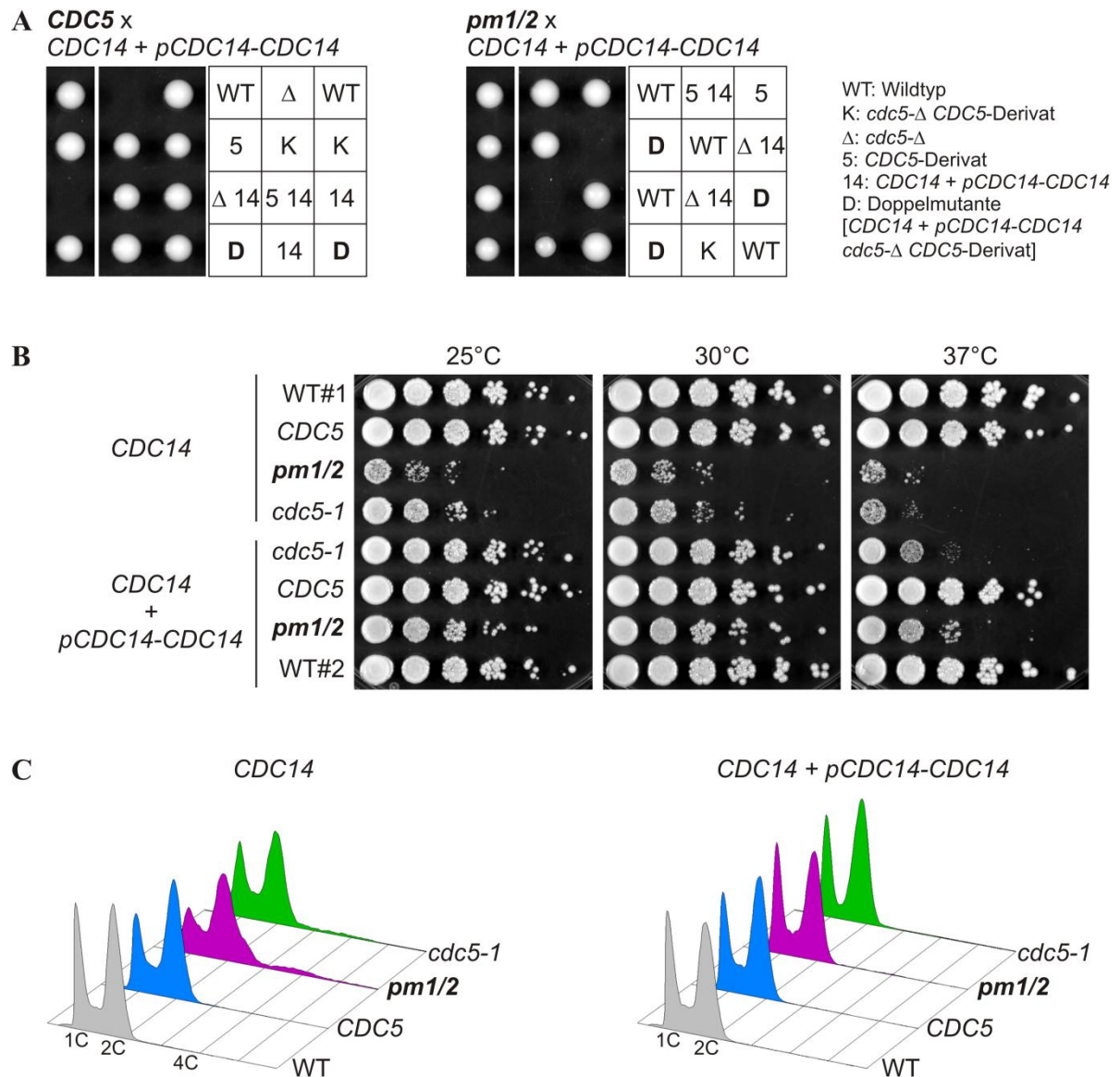


Abbildung 4.16 Cdc14-Überexpression supprimiert den Phänotyp von *cdc5pm1/2*-Mutanten

(A) Die Stämme W8394 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9*) und W8396 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9*) wurden mit dem Stamm W9730 (*ura3::pCDC14-CDC14-GFP-tCYC1-URA3*) gekreuzt und anschließend einer Tetradenanalyse unterzogen. Die haploiden Nachkommen wurden auf ihren Genotyp hin untersucht.

(B) Um das Wachstum der Stämme W9763 WT#1 (*CDC14-GFP-tCYC1-URA3*), W10318 (*CDC14-GFP-tCYC1-URA3 cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9*), W10319 (*CDC14-GFP-tCYC1-URA3 cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9*), W10510 (*CDC14-GFP-tCYC1-URA3 cdc5-1*), W10511 (*ura3::pCDC14-CDC14-GFP-tCYC1-URA3 cdc5-1*), W10514 (*ura3::pCDC14-CDC14-GFP-tCYC1-URA3 cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9*), W10515 (*ura3::pCDC14-CDC14-GFP-tCYC1-URA3 cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9*) und W9730 WT#2 (*ura3::pCDC14-CDC14-GFP-tCYC1-URA3*) zu testen, wurden die Zellen über Nacht bei 25°C kultiviert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen

ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml in 1:10er Schritten bis 1 x 10⁻⁵ OD₆₀₀/ml hergestellt und auf XYD-Platten aufgebracht. Die Platten wurden 2 Tage bei 25°C, 30°C und 37°C inkubiert.

(C) Für die Bestimmung des DNA-Gehalts, wurden die Zellen in XYR bei 25°C kultiviert und in ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit 70% Ethanol fixiert. Die DNA wurde mit Sytox Green gefärbt und der DNA-Gehalt am Durchflusszytometer bestimmt (1C = G1-Phase, 2C = M-Phase, 4C = Re-Replikation).

Zudem bestätigten die Analyse der DNA-Profile die Ergebnisse aus den Wachstumsstudien. Das sichtbar veränderte DNA-Profil von *cdc5pm1/2*-Mutanten bei endogener Cdc14-Menge war durch überexprimiertes Cdc14 nicht mehr zu sehen. Das DNA-Profil war vergleichbar mit dem der WT- und der *CDC5*-Zellen. Gleiches galt auch für die *cdc5-1* Mutante (Abb. 4.16 C).

Zusammengefasst lässt sich aus den genetischen Interaktionsstudien schließen, dass die N-terminalen Phosphorylierungen wichtig für die biologische Funktion von Cdc5 sind und vermutlich für die Cdc14-Aktivierung eine Rolle spielen.

4.3.5 Cdc14-Freisetzung ist in der *cdc5pm1/2*-Mutante beeinträchtigt

Cdc14 wird bis zur Anaphase im Nukleolus verankert und erst durch FEAR und MEN in den Zellkern und ins Zytoplasma freigesetzt. Zum Ende der Mitose kehrt Cdc14 wieder zurück in den Nukleolus (Shou *et al.*, 1999; Visintin *et al.*, 1999). Im Zytoplasma lokalisiert Cdc14 asymmetrisch am Spindelpolkörper der Tochterzelle, an dem sich die MEN-Komponenten befinden. Die zellzyklusspezifische Veränderung der Lokalisation von Cdc14 wurde genutzt, um mittels *live-cell imaging* eine mögliche Beeinträchtigung der Cdc14-Aktivierung in der *cdc5pm1/2*-Mutante zu untersuchen. Dazu wurden zunächst Zeitrafferaufnahmen von *cdc5-Δ* *CDC5*- und *cdc5-Δ cdc5pm1/2*-Stämmen mit Cdc14-GFP und markiertem SPK (Spc42-3mCherry) am konfokalen Mikroskop gemacht. Anschließend wurden diese hinsichtlich der Dauer der Cdc14-Freisetzung und der Dauer der Spindel-Elongation quantifiziert (n = 20). Für die Dauer der Cdc14-Freisetzung wurde die Zeit gemessen, in der das Cdc14-GFP-Signal am SPK in der Tochterzelle zu sehen war. Die Dauer der Spindel-Elongation wurde anhand des sich vergrößernden Abstands zwischen den beiden SPK in Abhängigkeit der Zeit bestimmt.

Die Auswertung der Mikroskopie-Daten zeigte, dass die Cdc14-Freisetzung in *cdc5-Δ* *CDC5*-Zellen in der Regel 15 bis 20 min dauerte. Dagegen fiel die Cdc14-Freisetzung in *cdc5-Δ cdc5pm1/2*-Zellen sehr unterschiedlich aus. Teilweise dauerte sie doppelt so lange wie in *cdc5-Δ* *CDC5*-Zellen und teilweise wurde Cdc14 überhaupt nicht freigesetzt. Es wurden aber

auch Zellen beobachtet, in denen Cdc14 vergleichbar wie in *cdc5-Δ* CDC5-Zellen freigesetzt wurde (Abb. 4.17 A).

Durch FEAR freigesetztes Cdc14 ist für die Stabilisierung und die Elongation der Spindel notwendig (Rock und Amon, 2009). Somit ist die Spindel-Elongation an die Freisetzung von Cdc14 gekoppelt. Dies zeigte sich auch anhand der Ergebnisse zur Dauer der Spindel-Elongation in der *cdc5pm1/2*-Mutante. Vermutlich als Folge der beeinträchtigten Cdc14-Freisetzung dauerte auch die Spindel-Elongation in der *cdc5pm1/2*-Mutante länger als in *cdc5-Δ* CDC5-Zellen (Abb. 4.17 B).

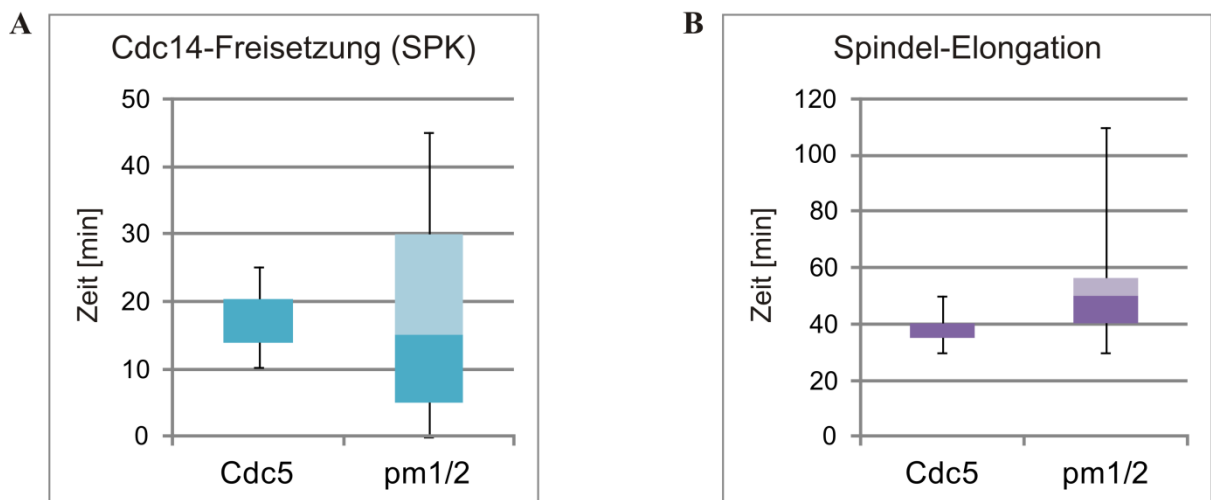


Abbildung 4.17 Cdc14-Freisetzung und Spindel-Elongation sind in der *cdc5pm1/2*-Mutante beeinträchtigt

Die Zellen der Stämme W10986 (*CDC14-GFP-tCYC1-URA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1 cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9*) und W10987 (*CDC14-GFP-tCYC1-URA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1 cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und in ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit SD++-Agar für die Mikroskopie präpariert. Für 2 h wurde alle 5 min ein Z-Stapel aus 10 Ebenen mit einer Distanz von je 0,5 μm und einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Cdc14-GFP wurde mit 15% des 488 nm Lasers und Spc42-3mCherry mit 75% des 561 nm Lasers detektiert. Die Z-Stapel wurden mit Image J projiziert (maximale Intensität) und zu einem Film zusammengefügt. Je Stamm wurden 20 Zellen hinsichtlich der Dauer der Cdc14-Freisetzung am SPK (A) und der Dauer der Spindel-Elongation (B), gemessen anhand des Abstandes der beiden SPK, quantifiziert.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass die N-terminalen Cdk1-Phosphorylierungsstellen wichtig für die normale Funktion von Cdc5 sind und lassen vermuten, dass sie die Kinase-Aktivität von Cdc5, die für die Cdc14-Freisetzung nötig ist, positiv beeinflussen.

4.3.6 Mutation der N-terminalen Phosphorylierungsstellen hat einen Einfluss auf die Kinase-Aktivität von Cdc5 *in vivo*

Cdc5 ist nach Überexpression in der Lage, Cdc14 zu phosphorylieren (Visintin *et al.*, 2003). Um den Einfluss der N-terminalen Phosphorylierungen auf die Kinase-Aktivität von Cdc5 *in vivo* zu testen, wurde die Fähigkeit von Cdc5pm1/2 untersucht Cdc14 *in vivo* zu phosphorylieren. Dazu wurden Cdc5pm1/2 und weitere Cdc5-Derivate in asynchronen Zellen überexprimiert und die Phosphorylierung von Cdc14 mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen.

In Abbildung 4.18 ist zu sehen, dass Cdc14 bei endogenen Mengen an Cdc5 (*CDC5*) und vor der Induktion des *GAL1*-Promotors ($t = 0$) als scharfe Bande zu detektieren war. Infolge der Überexpression von Cdc5 (*pGAL1-CDC5*) wurde Cdc14 phosphoryliert. Die Cdc14-Phosphorylierung wurde in Form von mehreren Banden oberhalb des Cdc14-Signals sichtbar (Visintin *et al.*, 2003). Wenn eine Kinase-inaktive Mutante (K110M) verwendet wurde, konnte wie bei endogenem Cdc5 keine Cdc14-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Eine Deletion der ersten 72 N-terminalen Aminosäuren (ΔN) beeinträchtigte ebenfalls die Fähigkeit Cdc14 *in vivo* zu phosphorylieren. Die durch die Überexpression von Cdc5 ΔN erzeugte Phosphorylierung von Cdc14 war trotz deutlich höherer Proteinmenge von Cdc5 ΔN weniger ausgeprägt als bei der Überexpression von Cdc5. Die Überexpression von Cdc5pm1/2D konnte die Phosphorylierung von Cdc14 ähnlich stark induzieren wie die durch Cdc5. Dagegen waren die Phosphorylierungsbanden von Cdc14 nach der Überexpression von Cdc5pm1/2 etwas geringer als die bei Cdc5.

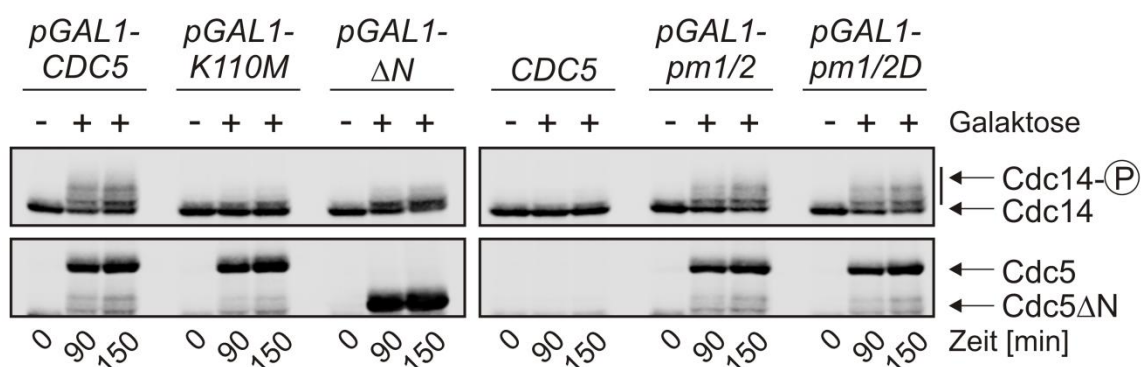


Abbildung 4.18 Cdc5pm1/2 kann die Cdc14-Phosphorylierung etwas schlechter induzieren

Die Zellen der Stämme W10799 (*CDC14-HA4-LEU2 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*), W10800 (*CDC14-HA4-LEU2 ura3::pGAL1-FLAG3-cdc5K110M-tCYC1-URA3*), W10801 (*CDC14-HA4-LEU2 ura3::pGAL1-FLAG3-cdc5 ΔN 72-tCYC1-URA3*), W5223 (*CDC14-HA4-LEU2*), W10802 (*CDC14-HA4-LEU2 ura3::pGAL1-FLAG3-cdc5pm1/2-tCYC1-URA3*) und W10803 (*CDC14-HA4-LEU2 ura3::pGAL1-FLAG3-cdc5pm1/2D-tCYC1-URA3*) wurden in XYR bei 25°C kultiviert und der *GAL1*-Promotor mit 2% Galaktose in

der exponentiellen Wachstumsphase induziert. Vor der Induktion und 90 min sowie 150 min nach der Induktion wurden Proben für die Westernblot-Analyse geerntet und aufgearbeitet. Der Nachweis von Cdc14 erfolgte über das C-terminale HA4-Epitop mit dem α -ha-Antikörper 12CA5. Die Cdc5-Derivate wurden anhand ihres N-terminalen FLAG3-Epitops mit dem α -flag-Antikörper M2 detektiert.

Daraus lässt sich schließen, dass die N-terminalen Cdk1-Phosphorylierungen einen positiven Einfluss auf die Kinase-Aktivität von Cdc5 haben, da Cdc5pm1/2 im Gegensatz zu Cdc5pm1/2D leicht beeinträchtigt ist.

Der Einfluss der N-terminalen Phosphorylierungen auf die Kinase-Aktivität von Cdc5 *in vivo* wurde zusätzlich anhand der Cdc5-abhängigen Phosphorylierung der Kohäsin-Untereinheit Scc1 und der MEN-Komponente Bfa1 getestet. Anders als bei der Cdc14-Phosphorylierung durch Überexpression von Cdc5, wurde dies in *cdc5-Δ CDC5*- und *cdc5-Δ cdc5pm1/2*-Zellen anhand von Synchronexperimenten überprüft. Dazu wurden die Zellen durch Zugabe des Paarungspheromons α -Faktor in der G1-Phase arretiert und anschließend in den nächsten Teilungszyklus entlassen. Nach dem G1-Arrest (α) wurden alle 15 min Proben geerntet und für die Westernblot-Analyse sowie die Durchflusszytometrie aufgearbeitet.

Scc1 wird durch Cdc5 in der Metaphase hyperphosphoryliert, wodurch die Spaltung durch die Separase Esp1 erleichtert und die Trennung der Schwesterchromatiden induziert wird (Alexandru *et al.*, 2001). In Abbildung 4.19 A ist gezeigt, dass, sobald Cdc5 und Clb2 auftraten, Scc1 phosphoryliert wurde, da Scc1 nach 60 min als Doppelbande zu sehen war. Nach 75 min hatten Cdc5 und Clb2 ihr maximales Expressionslevel erreicht und Scc1 existierte nur noch als hyperphosphorylierte Form. Danach nahm das Scc1-Signal ab und ein schneller laufendes Spaltprodukt von Scc1 wurde sichtbar (Bande nicht gezeigt). Nach 105 min konnte kaum noch eine Bande von Cdc5 und Clb2 detektiert werden.

Im Fall der Phospho-Mutante *cdc5pm1/2* war das Auftreten von Clb2 und Cdc5pm1/2 wie bei Cdc5 nach 60 min zu sehen. Dies lässt vermuten, dass die Transkription des *CLB2*-Genclusters in der *cdc5pm1/2*-Mutante nicht beeinflusst ist. Allerdings konnte die Phosphorylierung von Scc1 erst nach 75 min beobachtet und Scc1 nicht vollständig hyperphosphoryliert werden. Dennoch verschwand das Scc1-Signal in der Phospho-Mutante ebenfalls nach 90 min. Cdc5pm1/2 und Clb2 erreichten ihren maximalen Level erst nach 90 min und das Verschwinden der Signale war erst nach 120 min zu sehen. Dies lässt vermuten, dass der Austritt aus der Mitose in der *cdc5pm1/2*-Mutante verzögert ist.

Anhand der DNA-Profile zeigte sich, dass die Synchronität der Zellen bis ca. 105 min vergleichbar war und dann zum Ende des Experiments verloren ging (Abb. 4.19).

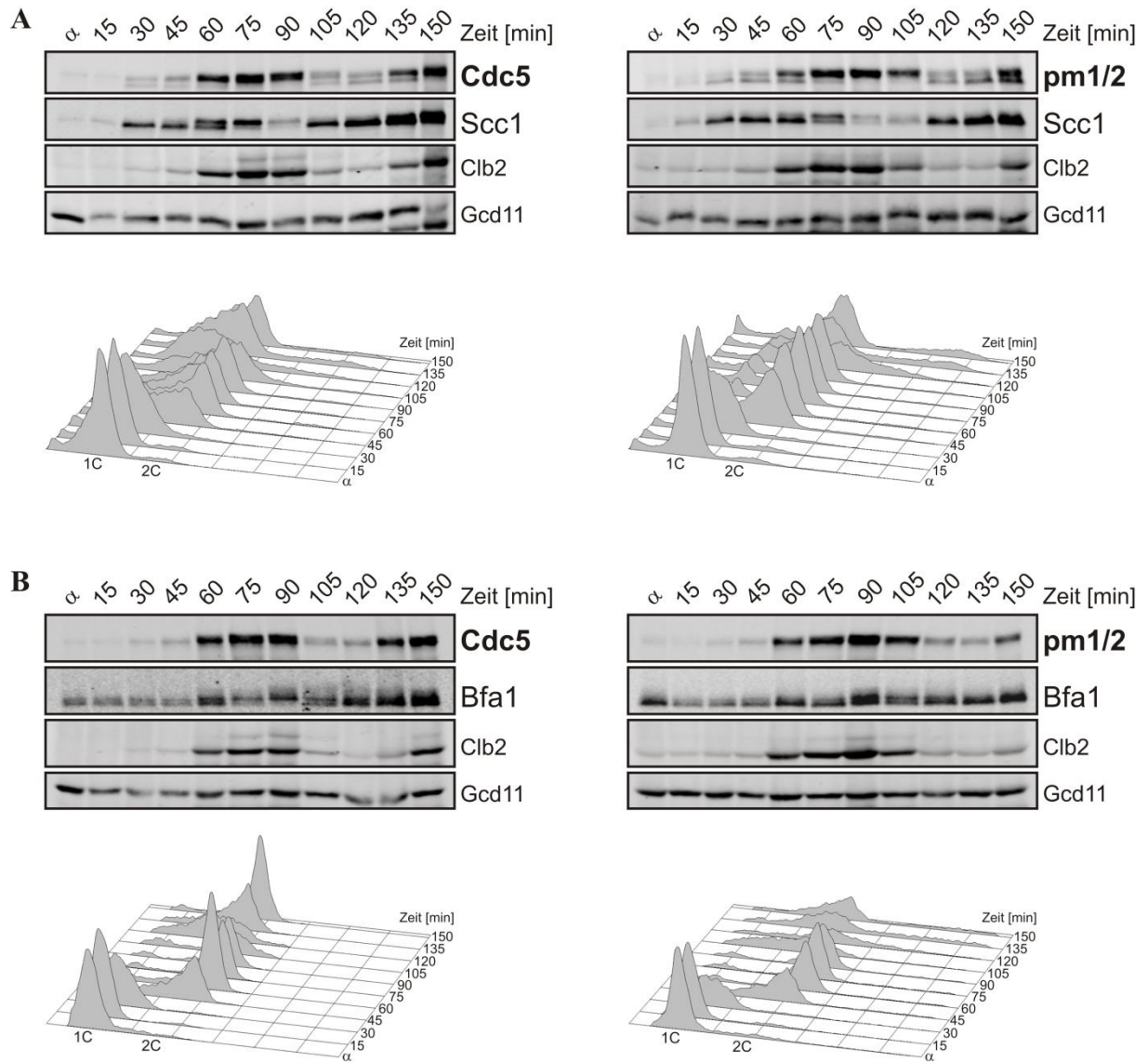


Abbildung 4.19 Zellzyklusspezifische Phosphorylierung von Scc1 und Bfa1 in der *cdc5pm1/2*-Mutante

Die Zellen der Stämme (A) W8483 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-CDC5-MYC9-LEU2 SCC1-HA3-natMX4*) und W8485 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9-LEU2 SCC1-HA3-natMX4*) und (B) W8753 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-CDC5-MYC9-LEU2 BFA1-HA3-natMX4*) und W8754 (*MATa bar1-Δ::kanMX4 cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9-LEU2 BFA1-HA3-natMX4*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe des Paarungspheromons α -Faktor (50 ng/ μ l) in der G1-Phase arretiert. Nach 3h Arrest wurden die Zellen in pheromonfreies Medium umgesetzt und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben für die Westernblot-Analyse und die Durchflusszytometrie geerntet. In der Westernblot-Analyse wurden Cdc5 und Cdc5pm1/2 über ihr C-terminales MYC9-Epitop mit dem α -myc-Antikörper 9E10, Scc1 und Bfa1 über ihr C-terminales HA3-Epitop mit dem α -ha-Antikörper 12CA5 und Clb2 mittels α -Clb2-Serum nachgewiesen. Gcd11 diente als Ladekontrolle und wurde mit Hilfe des α -Gcd11-Serums nachgewiesen. Für die Durchflusszytometrie wurde die DNA mit Sytox Green gefärbt und anschließend der DNA-Gehalt der Zellen gemessen (1C = G1-Phase und 2C = M-Phase).

Die Hyperphosphorylierung von Bfa1 durch Cdc5 hat zur Folge, dass Bfa1 in seiner GAP-Funktion gehemmt wird und dadurch MEN aktiviert werden kann (Hu *et al.*, 2001). Durch die Aktivierung von MEN wird Cdc14 aktiv und der Austritt aus der Mitose eingeleitet. Cdc5, Cdc5pm1/2 und Clb2 fluktuieren in Abb. 4.19 B vergleichbar wie in Abb. 4.19 A. Auch hier waren die Maxima von Cdc5pm1/2 und Clb2 in der Phospho-Mutante erst nach 90 min erreicht und der Abbau begann nach 105 min (Abb. 4.19 B). Dagegen waren die Cdc5- und Clb2-Level im *CDC5*-Stamm nach 75 min maximal und der Abbau begann nach 90 min. Dies bestätigt die Vermutung, dass in der Phospho-Mutante der Austritt aus der Mitose verzögert ist.

Während der M-Phase, vor allem nach der Spaltung von Scc1 (90 min) lag Bfa1 im *CDC5*-Stamm in seiner hyperphosphorylierten Form vor. In der Phospho-Mutante kam es nicht zur Hyperphosphorylierung von Bfa1. Bfa1 konnte auch nach 90 min nur als Doppelbande detektiert werden (Abb. 4.19 B).

Da die Phosphorylierung von Bfa1 und Scc1 sowie der Beginn der Degradation von Cdc5pm1/2 und Clb2 in der Phospho-Mutante beeinflusst war, lässt sich daraus schließen, dass in der *cdc5pm1/2*-Mutante anscheinend die Kinase-Aktivität von Cdc5 beeinträchtigt ist. Allerdings scheint die Transkription des *CLB2*-Genclusters nicht beeinflusst zu sein.

Um am Ende der Mitose Cdc14 zu aktivieren, lokalisieren die MEN-Komponenten am SPK (Gruneberg *et al.*, 2000; Valerio-Santiago und Monje-Casas, 2011). Für die Lokalisation von Cdc5 am SPK ist die PBD notwendig, die die Bindung an bereits phosphorylierte Cdc5-Substrate vermittelt (Song *et al.*, 2000; Elia *et al.*, 2003b). Die Phosphorylierung von Bfa1 war in der *cdc5pm1/2*-Mutante geringer, aber die asymmetrische Bfa1-Lokalisation am dSPK war dadurch nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die Lokalisation von Cdc5 an den SPK in Abhängigkeit von Bfa1 untersucht. Dazu wurden eCdc5-GFP, Cdc5-GFP und Cdc5pm1/2-GFP in *bfa1-Δ* Zellen analysiert und zur Visualisierung der SPK Spc42-3mCherry verwendet.

In Abbildung 4.20 A ist gezeigt, dass sowohl eCdc5-GFP als auch Cdc5-GFP und Cdc5pm1/2-GFP in *bfa1-Δ* Zellen von der S-Phase bis zum Ende der M-Phase an den SPK zu finden waren. Daraus lässt sich folgern, dass Cdc5 während des Zellzyklus unabhängig von Bfa1 am SPK lokalisiert.

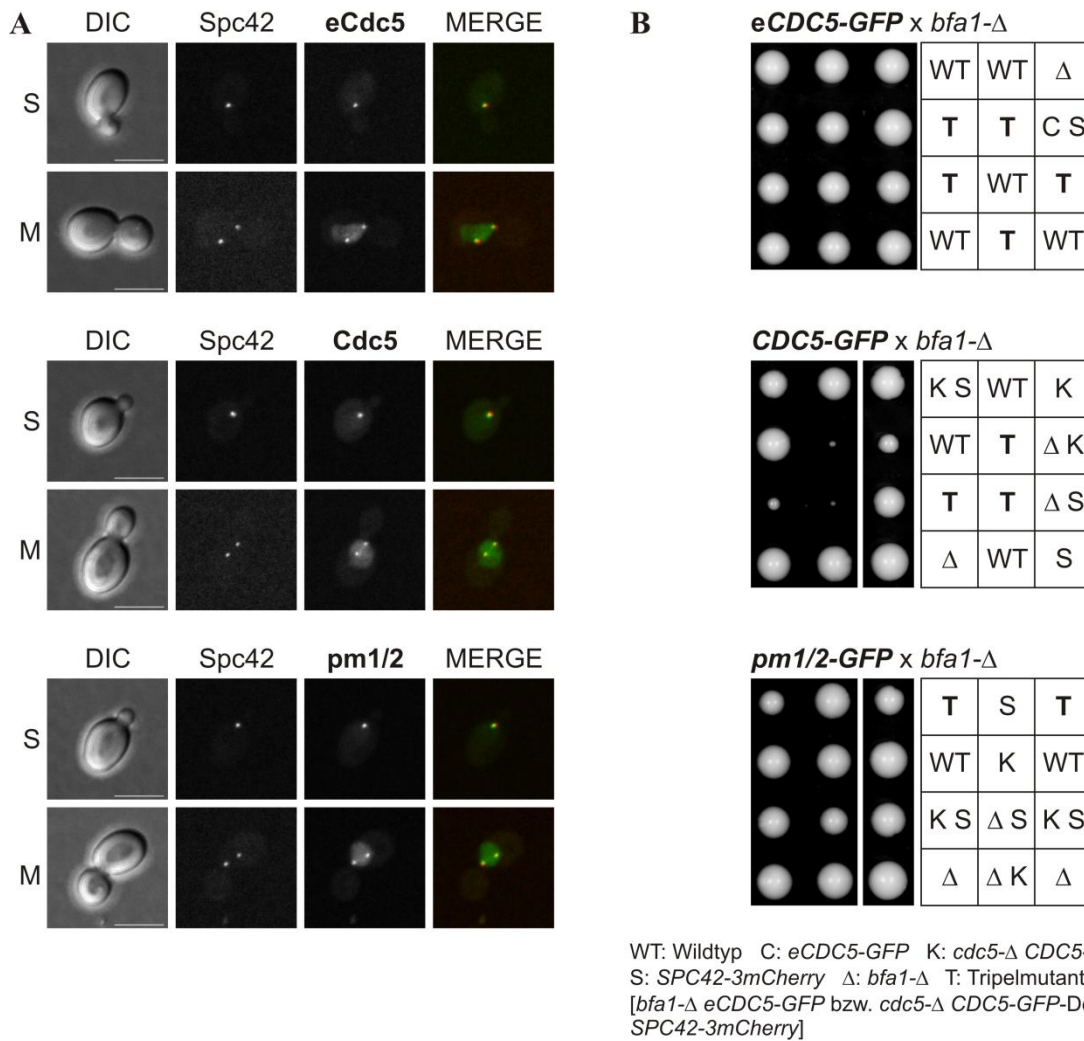


Abbildung 4.20 Cdc5 lokalisiert unabhängig von Bfa1 am SPK

(A) Die Zellen der Stämme W10881 (*bfa1-Δ::kanMX4 CDC5-GFP-CaURA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*), W10882 (*bfa1-Δ::kanMX4 cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-CDC5-GFP-tADH1-LEU2 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*) und W10883 (*bfa1-Δ::kanMX4 cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-GFP-tADH1-LEU2 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und in ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit SD++-Agarose für die Mikroskopie präpariert. Es wurden Z-Stapel bestehend aus 10 Ebenen mit einer Distanz von 0,5 μm und einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Endogenes Cdc5-GFP wurde mit 40% des 488 nm Lasers, Cdc5-GFP-Derivate mit 20% des 488 nm Lasers und Spc42-3mCherry mit 75% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und für die S- und frühe M-Phase repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 μm).

(B) Die Stämme W10535 (*CDC5-GFP-CaURA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*), W10787 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-CDC5-GFP-tADH1-LEU2 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*) und W10788 (*cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-GFP-tADH1-LEU2 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*) wurden mit dem Stamm W10791 bzw. W10792 (*bfa1-Δ::kanMX4*) gekreuzt und anschließend einer Tetradenanalyse unterzogen. Die haploiden Nachkommen wurden auf ihren Genotyp hin untersucht.

Allerdings zeigte sich bei der Herstellung der Stämme eine interessante genetische Interaktion. Endogene Proteinmengen von Cdc5-GFP in Verbindung mit *bfa1-Δ* und Spc42-3mCherry hatten keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen (Abb. 4.20 B oben). Im Gegensatz dazu wuchsen die Sporen mit erhöhten Cdc5-GFP-Mengen (vgl. Abb. 4.13) und *bfa1-Δ* deutlich schlechter (Δ K). Dieser Effekt wurde durch Spc42-3mCherry weiter verstärkt (T, Abb. 4.20 B mitte). Bei der Tripelmutante mit Cdc5pm1/2-GFP war dieser Wachstumsdefekt nicht so stark zu sehen. Zusätzlich zeigte die Tetradenanalyse, dass die erhöhte Menge an Cdc5pm1/2-GFP (vgl. Abb. 4.13) bei der Komplementation von *cdc5-Δ* den zuvor beobachteten phänotypischen Effekt nicht aufwies (K und Δ K, Abb. 4.20 B unten). Daraus lässt sich schließen, dass erhöhte Mengen an Cdc5 in Kombination mit erhöhter MEN-Aktivität für die Zellen problematisch sind. Zudem bestätigen diese Ergebnisse, dass Cdc5pm1/2 in seiner biologischen Funktion eingeschränkt ist, da die erhöhte MEN-Aktivität in Kombination mit Cdc5pm1/2 das Wachstum der Zellen nicht beeinflusst.

Zusammengefasst lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass die Phosphorylierung der Cdk1-Konsensussequenzen im N-terminalen Bereich zur biologischen Funktion von Cdc5 beiträgt und zusätzlich zur Phosphorylierung von T242 die Kinase-Aktivität *in vivo* stimuliert. Da in *cdc5pm1/2*-Mutanten vor allem die Cdc14-Freisetzung beeinträchtigt war, unterstreichen diese Ergebnisse die wichtige Funktion von Cdc5 als FEAR und MEN-Komponente.

4.4 Cdc5 im Spindelkontrollsystem

Cdc5 unterstützt als Komponente der FEAR- und MEN-Signalwege den Austritt aus der Mitose (Archambault und Glover, 2009). Während der Mitose ist Cdc5 maximal exprimiert. Kommt es zu einem fehlerhaften Anheften von Chromosomen durch Mikrotubuli oder zu unbesetzten Kinetochoren, wird das Spindelkontrollsystem aktiviert und die Zellen arretieren in der Metaphase (Musacchio und Salmon, 2007; Kim und Yu, 2011). Bisher ist über eine direkte Beteiligung von Cdc5 im SAC nichts bekannt. Dagegen wird der Plk1 in humanen Zellen sowohl eine Rolle bei der Aktivierung als auch bei der Inaktivierung des SAC zugeschrieben (Chi *et al.*, 2008; Petronczki *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012a). Da erhöhte Mengen von Cdc5 zur Degradation von Pds1 in Nocodazol-arretierten Zellen führen (Neutzner, 2003), stellt sich die Frage, ob Cdc5 auch in *S. cerevisiae* im SAC beteiligt ist.

4.4.1 Cdc5 ist ein Gegenspieler des Spindelkontrollsystems

Um eine Funktion von Cdc5 im Spindelkontrollsystem zu untersuchen, wurde das SAC durch Zugabe des Spindelgifts Nocodazol aktiviert. Zusätzlich zur Pds1-Abnahme wurde der Einfluss von erhöhten Cdc5-Mengen auf das SAC anhand von zwei weiteren Kriterien, der Clb2-Abnahme und des Sic1-Anstiegs, genauer analysiert. Zudem ist bekannt, dass die Überexpression von Cdc5 in Nocodazol-arretierten Zellen zur Hyperphosphorylierung von Clb2 führt (Neutzner, 2003; Arnold, 2008). Zur Überexpression wurde *CDC5* unter die Kontrolle des induzierbaren *GALI*-Promotors gestellt. Die Zellen wurden zunächst durch Zugabe von Nocodazol (7,5 µg/ml) in der Metaphase arretiert und anschließend durch Zugabe von 2% Galaktose die Cdc5-Überexpression induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben geerntet und die Abnahmen von Pds1 und Clb2 sowie der Anstieg von Sic1 mittels Westernblot-Analyse verfolgt.

In Wildtyp-Zellen blieben die Pds1- und Clb2-Mengen nach Aktivierung des SAC konstant. Ein Anstieg des Sic1-Signals war kaum zu sehen (Abb. 4.21 A). Dagegen führte die Überexpression von Cdc5 in Nocodazol-arretierten Zellen nicht nur zur Abnahme von Pds1, sondern auch von Clb2. Die Abnahme der Signale war nach 60 min Induktion zu sehen. Zusätzlich konnte nach 60 min-Überexpression ein Anstieg der Sic1-Menge beobachtet werden. Darüber hinaus nahm das Cdc5-Signal zum Ende des Experiments ebenfalls ab, was bedeutet, dass Cdc5 unter diesen Bedingungen seine eigene Degradation induzierte (Abb. 4.21 B). Daraus lässt sich schließen, dass sowohl der APC^{Cdc20} als auch der APC^{Hct1} trotz induziertem SAC durch erhöhte Mengen von Cdc5 aktiviert werden, da die Degradation von Pds1 APC^{Cdc20}-abhängig und die von Clb2 und Cdc5 APC^{Hct1}-abhängig ist (Cohen-Fix *et al.*, 1996; Schwab *et al.*, 1997; Shirayama *et al.*, 1998). Der Anstieg des Sic1-Levels deutet auf die Aktivierung von Cdc14 hin (Visintin *et al.*, 1998).

Um zu überprüfen, ob die Abnahme der Signale aufgrund von Degradation zustande kam und die Degradation von Pds1, Clb2 sowie Cdc5 von der Cdc14-Aktivität abhängig war, wurde das gleiche Experiment in *cdc16-1*, *cdc20-Δ*, *hct1-Δ* und *cdc14-3* Mutanten wiederholt.

Die Abbildung 4.21 C – E zeigt, dass es sich bei der Abnahme von Pds1, wie erwartet um die APC^{Cdc20}-vermittelte und bei Clb2 um eine teilweise APC^{Cdc20}-vermittelte Degradation handelte. In der *cdc16-1* und der *cdc20-Δ* Mutante war keine Abnahme der Signale von Pds1 und Clb2 zu sehen. Die Degradation von Clb2 wurde im Gegensatz zu Pds1 auch in der *hct1-Δ* Mutante größtenteils blockiert. In den *cdc16-1*, *cdc20-Δ* und *hct1-Δ* Mutanten konnte außerdem keine Degradation von Cdc5 detektiert werden.

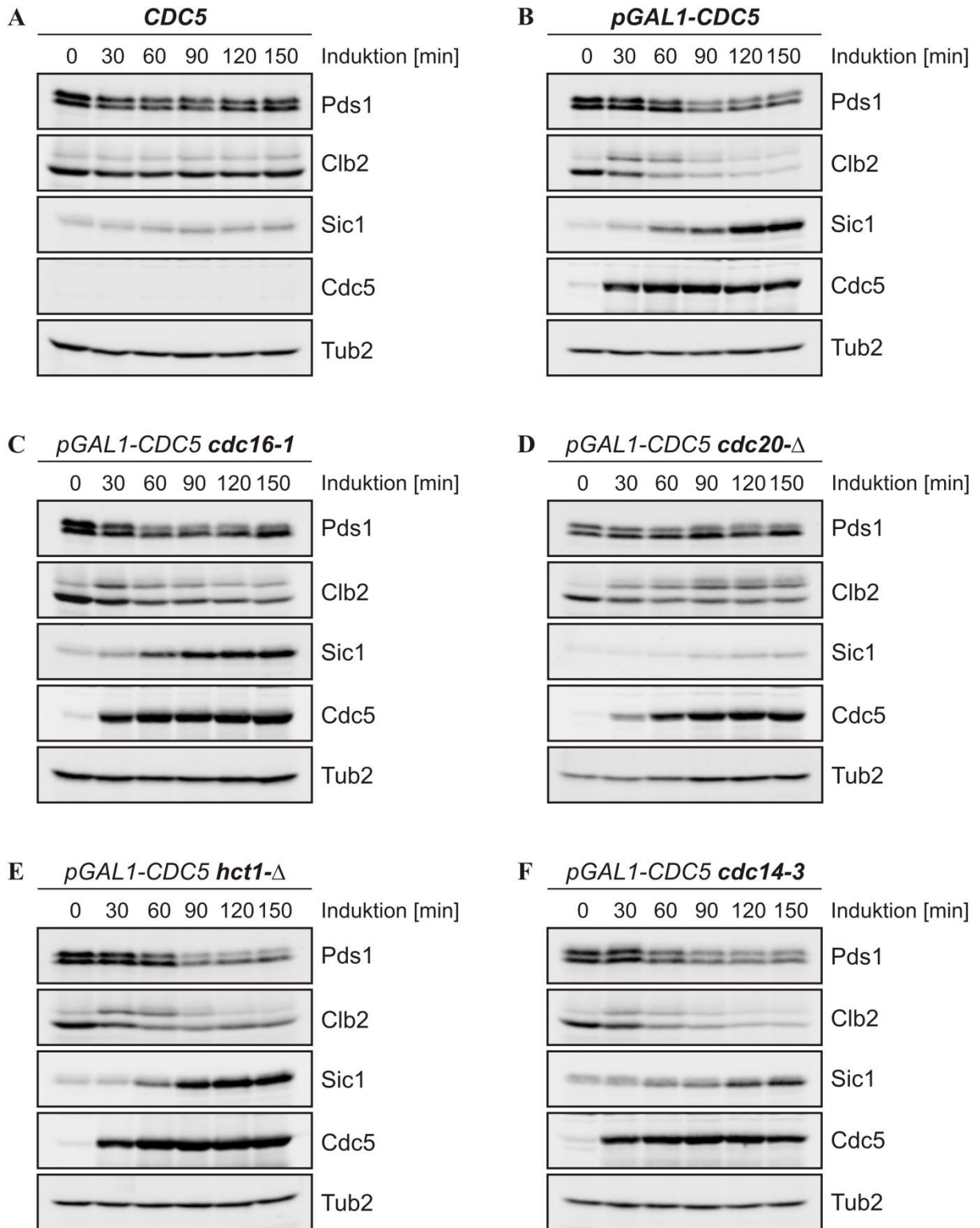


Abbildung 4.21 Überexpression von Cdc5 deaktiviert das Spindelkontrollsystem

Die Zellen der Stämme (A) W11242 (*PDS1-HA6-HIS3MX6 SIC1-MYC13-HIS3MX6*), (B) W10846 (*PDS1-HA6-HIS3MX6 SIC1-MYC13-HIS3MX6 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*), (C) W11076 (*cdc16-1 PDS1-HA6-HIS3MX6 SIC1-MYC13-HIS3MX6 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*), (E) W11075 (*hct1-Δ::LEU2 PDS1-HA6-HIS3MX6 SIC1-MYC13-HIS3MX6 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*) und (F) W11077 (*cdc14-3 PDS1-HA6-HIS3MX6 SIC1-MYC13-HIS3MX6 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*) wurden in XYR bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von

Nocodazol (7,5 µg/ml) 3 h arretiert. Die Zellen des Stammes (D) W12181 (*pMET3-HA3-CDC20-TRP1 PDS1-HA6-HIS3MX6 SIC1-MYC13-HIS3MX6 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*) wurden in SR-met bei 25°C angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase in XYR mit zusätzlich 2 mM Methionin umgesetzt, um die Expression von Cdc20 zu stoppen. Nach 2 h Repression des *MET3*-Promotors wurde der Kultur noch für 60 min Nocodazol (7,5 µg/ml) zugegeben. Der vollständige Arrest der Zellen in der M-Phase wurde überprüft und anschließend durch Zugabe von 2% Galaktose der *GAL1*-Promotor induziert. Gleichzeitig mit der Galaktose-Induktion wurde ein Temperaturwechsel von 25°C zu 30°C bzw. 35°C durchgeführt, um die temperatursensitiven Allele *cdc14-3* und *cdc16-1* auszuprägen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die nachfolgende Westernblot-Analyse geerntet und aufgearbeitet. Der Nachweis von Pds1 erfolgte über sein HA6-Epitop mit dem α -ha-Antikörper 12CA5, Sic1 über sein C-terminales MYC13-Epitop mit dem α -myc-Antikörper 9E10 und Cdc5 über sein N-terminales FLAG3-Epitop mit dem α -flag-Antikörper M2. Clb2 und Tub2 wurden mittels α -Clb2- bzw. α -Tub2-Serum detektiert. Tub2 diente dabei als Ladekontrolle. Aufgrund des ähnlichen Laufverhaltens von Pds1 und Sic1 wurden je Stamm zwei SDS-Gele beladen.

Anders als in der *cdc20-1* Mutante nahm der Sic1-Level sowohl in der *cdc16-1* als auch in der *hct1-1* Mutante zu. In der *cdc14-3* Mutante war die APC^{Cdc20}-abhängige Degradation von Pds1 und Clb2 zu sehen (Abb. 4.21 F). Da die Cdc5-Degradation und der Sic1-Anstieg schwach zu sehen waren, war die Aktivität von Cdc14 in dieser Mutante vermutlich nicht vollständig blockiert. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch von Bittner (2011) gezeigt werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass erhöhte Cdc5-Mengen das Spindelkontrollsystem deaktivieren, indem APC^{Cdc20} wieder aktiviert und Cdc14 freigesetzt wird. Die APC^{Cdc20}-Aktivierung ist vermutlich unabhängig von Cdc14 und die Deaktivierung des SAC benötigt Cdc20.

4.4.2 Erhöhte Mengen von Cdc5 lösen den MCC auf

Durch Aktivierung des Spindelkontrollsystems wird der MCC gebildet, um den APC^{Cdc20} zu inaktivieren. Der MCC besteht aus den Komponenten Mad2, Mad3 und Bub3, die Cdc20 binden (Musacchio und Salmon, 2007; Kim und Yu, 2011). Um die Rolle von Cdc5 im Spindelkontrollsystem weiter zu charakterisieren, wurde die Interaktion von Cdc20 und der MCC-Komponente Mad2 nach Cdc5-Überexpression analysiert. Dazu wurde eine Immunpräzipitation von Cdc20 durchgeführt und mittels Westernblot-Analyse Mad2 als Co-Präzipitat nachgewiesen. Die Immunpräzipitation wurde in asynchron gewachsenen (cyc), in Nocodazol-arretierten (Noc) und in Nocodazol-arretierten Zellen mit anschließender Induktion der Cdc5-Überexpression durchgeführt (90 und 150 min).

Die Co-Immunpräzipitation zeigte, dass nach Aktivierung des Spindelkontrollsystems eine starke Interaktion von Cdc20 und Mad2 nachgewiesen werden konnte (Noc). Dagegen war die Interaktion in asynchronen Zellen relativ gering (cyc, Abb. 4.22 A). Interessanterweise führte die Überexpression von Cdc5 zur Abnahme der Interaktion von Cdc20 und Mad2, im Gegensatz zu der konstant bleibenden Interaktion im WT.

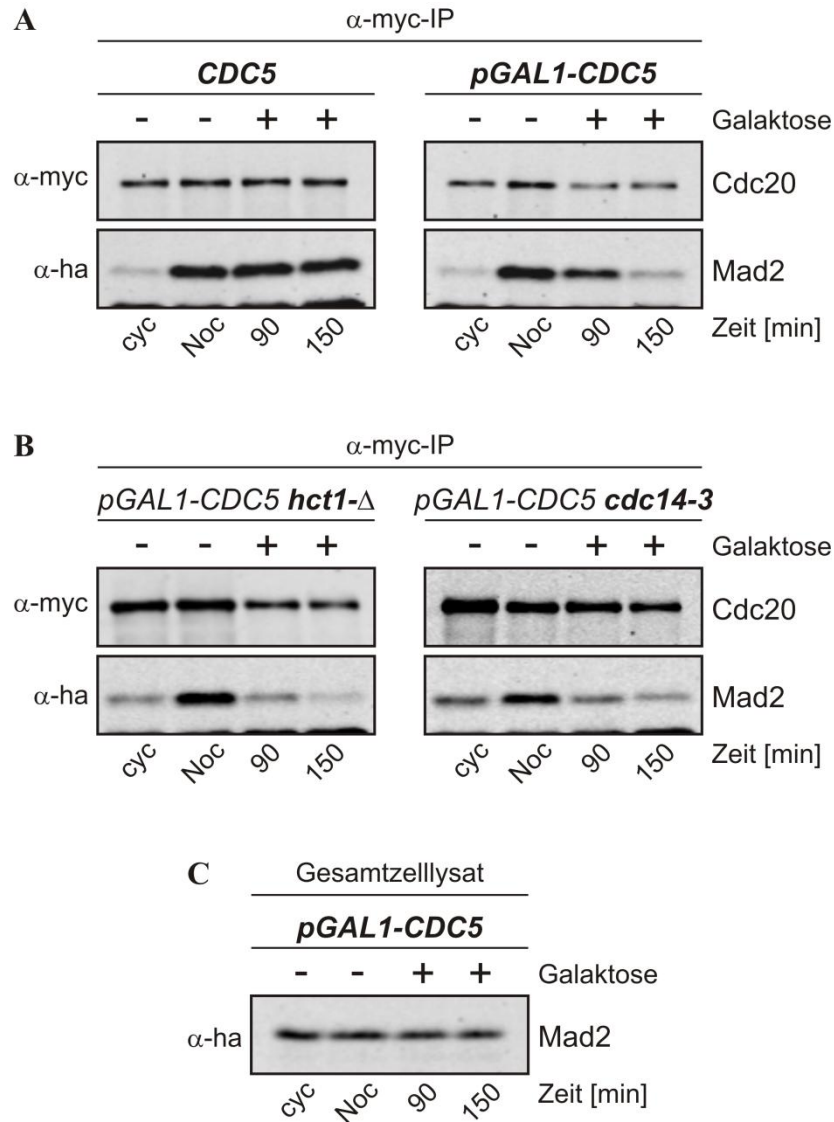


Abbildung 4.22 Überexpression von Cdc5 verhindert die Cdc20-Mad2-Interaktion

Die Zellen der Stämme (A) W10531 (*MYC18-CDC20-TRP1 MAD2-HA3-HIS3MX6*) und W10622 (*MYC18-CDC20-TRP1 MAD2-HA3-HIS3MX6 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*) sowie (B) W11082 (*MYC18-CDC20-TRP1 MAD2-HA3-HIS3MX6 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3 hct1-Δ::LEU2*) und W10983 (*MYC18-CDC20-TRP1 MAD2-HA3-HIS3MX6 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3 cdc14-3*) wurden in XYR bei 25°C angezogen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen durch Zugabe von Nocodazol (7,5 µg/ml) 3 h arretiert. Anschließend wurde der *GAL1*-Promotor durch Zugabe von 2% Galaktose induziert. Gleichzeitig zur Induktion des *GAL1*-Promotors wurde im Fall von W10983 ein Temperaturwechsel von 25°C zu 30°C durchgeführt, um das *cdc14-3* Allel auszuprägen. Für die Immunpräzipitation wurden Zellen

aus der asynchronen (cyc) und der Nocodazol-arretierten Kultur (Noc) sowie nach 90 min und 150 min Induktion des *GAL1*-Promotors geerntet und 200 OD₅₉₅ Protein eingesetzt. Cdc20 wurde mit Hilfe des α -myc-Antikörpers 9E10 über sein N-terminales MYC18-Epitop aus den Gesamtzellextrakten präzipitiert und in der Westernblot-Analyse mit dem 9E10-Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von co-präzipitiertem Mad2 und von Mad2 im Gesamtzelllysate des Stammes W10622 (C) erfolgte über sein C-terminales HA3-Epitop durch den α -ha-Antikörper 12CA5.

Die Überexpression von Cdc5 in Nocodazol-arretierten Zellen bewirkte zusätzlich die Abnahme des Cdc20-Präzipitats (Abb. 4.22 A). Dies lässt auf eine Cdc20-Degradation schließen. Allerdings war die Abnahme der Interaktion von Cdc20 mit Mad2 unabhängig von der Degradation von Cdc20, da die Interaktion im Gegensatz zur Degradation nach 90 min Cdc5-Überexpression weiter abnahm (vgl. Abb. 4.22 A 90 min mit 150 min). Die Mad2-Menge wurde während des Experiments nicht beeinflusst und blieb konstant (Abb. 4.22 C).

Um eine Cdc14-unabhängige Funktion von Cdc5 auf die Interaktion von Cdc20 und Mad2 zu überprüfen, wurde die Immunpräzipitation zusätzlich in *hct1-1* und *cdc14-3* Mutanten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der Einfluss von Cdc5 auf die Auflösung des MCC in den *hct1-1* und *cdc14-3* Mutanten unverändert war (Abb. 4.22 B). Nach 90 min Überexpression von Cdc5 konnte weniger Mad2 co-präzipitiert werden und nach 150 min war kaum noch eine Interaktion von Cdc20 mit Mad2 nachweisbar. Die Überexpression von Cdc5 beeinflusste aber nicht nur die Interaktion von Cdc20 und Mad2, sondern auch die von Cdc20 mit den anderen MCC-Komponenten Bub3 und Mad3 (Bittner, 2011). Außerdem konnte die Interaktion von Cdc20 und Mad2 durch die Überexpression von Cdc14 nicht im gleichen Maße verringert werden, wie die durch die Überexpression von Cdc5 (Daten nicht gezeigt).

Daraus lässt sich schließen, dass Cdc5 neben der bekannten Funktion den Austritt aus der Mitose zu fördern, die Interaktion von Cdc20 mit den anderen MCC-Komponenten verhindert.

4.4.3 Erhöhte Mengen von Cdc5 verhindern nicht die Interaktion von Mad1 mit Mad2

Für die Bildung des MCC ist die Interaktion von Mad1 und Mad2 essentiell. Mad1 ist notwendig, um Mad2 ans Kinetochor zu rekrutieren und dadurch die Konformationsänderung von Mad2, die für die Bindung an Cdc20 wichtig ist, zu induzieren (De Antoni *et al.*, 2005; Musacchio und Salmon, 2007). Um zu überprüfen, ob Cdc5 bereits die Interaktion von Mad1 mit Mad2 verhindert, wurde eine Immunpräzipitation von Mad1 durchgeführt und Mad2 als Co-Präzipitat anhand der Westernblot-Analyse nachgewiesen. Die Interaktion wurde erneut in

asynchron gewachsenen, in Nocodazol-arretierten und in Nocodazol-arretierten Zellen mit anschließender Cdc5-Überexpression analysiert.

Bereits in asynchronen Zellen zeigte sich eine starke Interaktion von Mad1 mit Mad2, die durch die Aktivierung des SAC nicht wie die von Cdc20 mit Mad2 verstärkt wurde. Die Überexpression von Cdc5 konnte die Interaktion von Mad1 mit Mad2 nicht beeinflussen, da über das gesamte Experiment konstante Mengen an Mad2 co-präzipitiert wurden (Abb. 4.23). Daraus lässt sich schließen, dass Cdc5 keinen Einfluss auf die Mad1-Mad2-Interaktion hat, sondern die Interaktion der MCC-Komponenten verhindert.

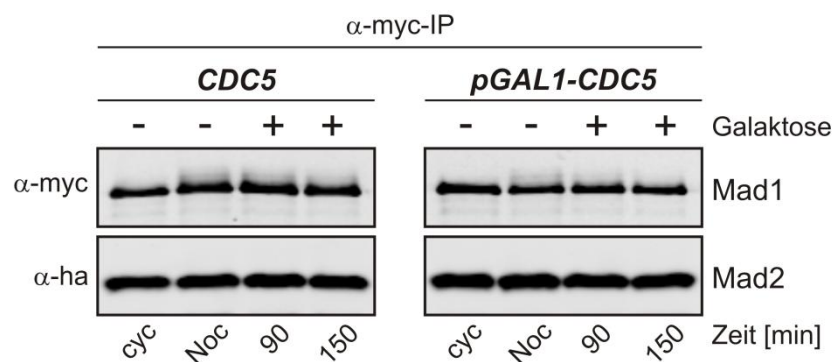


Abbildung 4.23 Überexpression von Cdc5 hat keinen Einfluss auf Mad1-Mad2-Interaktion

Die Zellen der Stämme W11276 (*MAD1-MYC13-TRP1 MAD2-HA3-HIS3MX6*) und W11277 (*MAD1-MYC13-TRP1 MAD2-HA3-HIS3MX6 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*) wurden in XYR bei 25°C angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von Nocodazol (7,5 µg/ml) 3 h arretiert. Anschließend wurde der *GAL1*-Promotor durch Zugabe von 2% Galaktose induziert. Für die Immunpräzipitation wurden erneut Zellen aus der asynchronen (cyc) und der Nocodazol-arretierten Kultur (Noc) sowie nach 90 min und 150 min Induktion des *GAL1*-Promotors geerntet und 200 OD₅₉₅ Protein eingesetzt. Mad1 wurde mit Hilfe des α-myc-Antikörpers 9E10 über sein C-terminales MYC13-Epitop aus den Gesamtzellextrakten präzipitiert und in der Westernblot-Analyse nachgewiesen. Der Nachweis von co-präzipitiertem Mad2 erfolgte über sein C-terminales HA3-Epitop durch den α-ha-Antikörper 12CA5.

4.4.4 Erhöhte Mengen von Cdc5 beeinflussen die Kinetochor-Lokalisation der SAC-Komponenten

Mad1 und Mad2 bilden bereits während des Zellteilungszyklus und nach Nocodazol-Behandlung einen stabilen Komplex, der durch erhöhte Mengen von Cdc5 nicht zerstört wird (siehe 4.4.3). Da allerdings die Aufrechterhaltung des MCC von Cdc5 verhindert wurde (siehe 4.4.2), ist durchaus vorstellbar, dass durch erhöhte Mengen von Cdc5 die Rekrutierung der SAC-Komponenten ans Kinetochor beeinflusst wird. Um einen möglichen Einfluss von Cdc5 auf die Lokalisation von Mad1 und den MCC-Komponenten zu untersuchen, wurde an

Mad1, Mad2, Mad3 und Bub3 C-terminal GFP fusioniert und deren Lokalisation am konfokalen Mikroskop analysiert. Zur Visualisierung der Kinetochore wurde Ndc80 verwendet, das sowohl als GFP- als auch als 3mCherry-Fusion die typische Kinetochor-Cluster-Lokalisation zwischen den SPK in der Metaphase zeigte (Abb. 4.24 cyc; He *et al.*, 2000; He *et al.*, 2001). In Nocodazol-arretierten Zellen waren häufig ein starkes und ein schwaches Signal des Kinetochor-Markers Ndc80 zu sehen, wobei das Haupt-Signal (starke) mit dem SPK co-lokalisierte und das Schwache etwas vom SPK entfernt lokalisierte (Abb. 4.24 NOC). Das starke Signal repräsentiert das Kinetochor-Cluster und das schwache Signal ein unbesetztes Kinetochor (Gillett *et al.*, 2004).

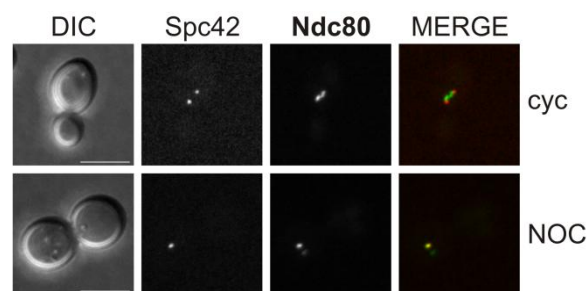


Abbildung 4.24 Kinetochor-Cluster co-lokalisiert mit SPK in Nocodazol-arretierten Zellen

Die Zellen des Stammes W11648 (*NDC80-GFP-tCYC1-URA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von Nocodazol (7,5 µg/ml) 3 h arretiert. Aus der asynchronen und der Nocodazol-arretierten Kultur wurden Zellen geerntet und mit SD++-Agarose für die Mikroskopie präpariert. Es wurden Z-Stapel mit 10 Ebenen und einer Distanz von 0,5 µm sowie einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Ndc80-GFP wurde mit 80% des 488 nm Lasers und Spc42-3mCherry mit 80% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und für die Zeitwerte repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 µm).

4.4.4.1 Erhöhte Mengen von Cdc5 verringern die Kinetochor-Lokalisation von Mad1

Mad1 lokalisiert während des Zellteilungszyklus an den Kernporenkomplexen und in Nocodazol-arretierten Zellen zusätzlich an den unbesetzten Kinetochoren (Iouk *et al.*, 2002; Gillett *et al.*, 2004). Um eine mögliche Veränderung der Lokalisation von Mad1 nach Cdc5-Überexpression zu untersuchen, wurde zunächst das Mad1-GFP-Signal in Nocodazol-arretierten Zellen hinsichtlich der erwarteten Lokalisation am Kinetochor überprüft. Dazu wurde zur Co-Lokalisation einerseits Ndc80-3mCherry als Kinetochor-Marker und andererseits Spc42-3mCherry als SPK-Marker verwendet.

Die Mikroskopie-Daten zeigten, dass Mad1-GFP in Nocodazol-arretierten Zellen wie erwartet als nukläres, punktförmiges Signal lokalisierte. Dabei trat in 86% der analysierten Zellen ein

punktförmiges Signal und in 7% der Zellen zwei Foci auf (Daten nicht gezeigt). Die Mad1-GFP-Foci überlagerten überwiegend mit dem schwachen Ndc80-3mCherry oder blieben ohne Ndc80-Signal (Abb. 4.25 A). Die Co-Lokalisation von Mad1 mit Spc42 zeigte größtenteils keine Überlagerung der Signale. In Nocodazol-arretierten Zellen war überwiegend ein SPK-Signal vorhanden und bei 81% der analysierten Zellen war das punktförmige Mad1-GFP-Signal nicht mit dem SPK überlagert (Abb. 4.25 B).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass Mad1-GFP in Nocodazol-arretierten Zellen an den unbesetzten Kinetochoren lokalisiert und stellten zusätzlich sicher, dass die hier verwendete Mad1-GFP-Fusion sich wie erwartet verhielt.

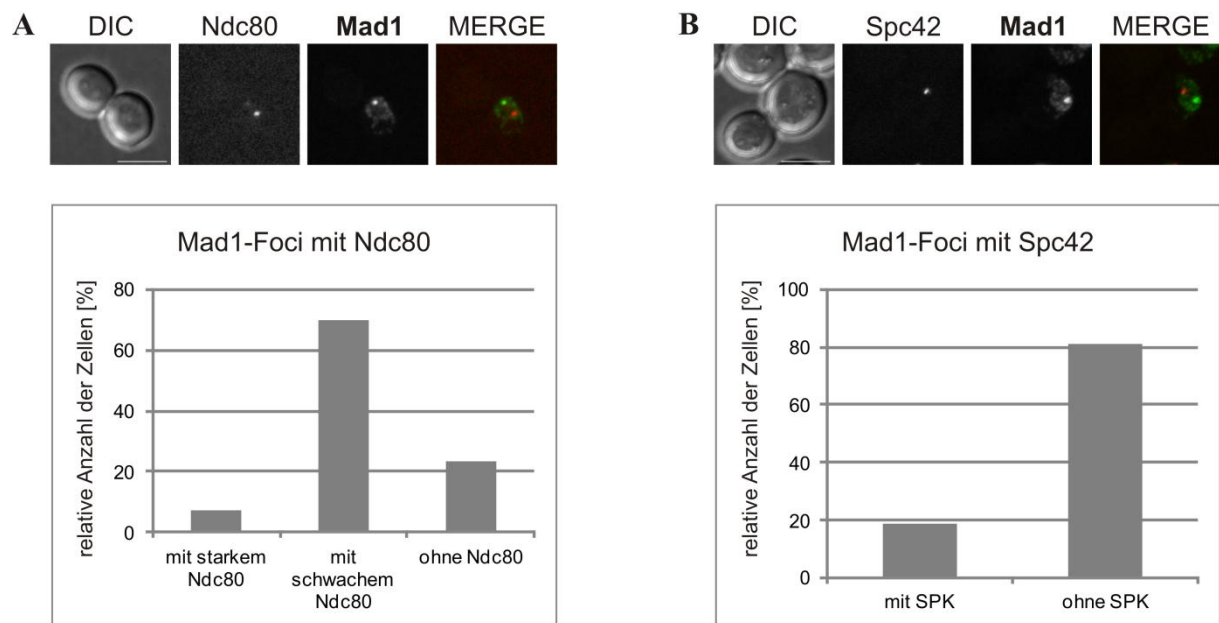


Abbildung 4.25 Mad1-Foci co-lokalisieren überwiegend mit unbesetzten Kinetochoren

Die Zellen der Stämme (A) W11440 (*MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1*) und (B) W11594 (*MAD1-GFP-CaURA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von Nocodazol (7,5 µg/ml) 3 h arretiert. Die Präparation der Zellen und die Aufnahmen am Mikroskop wurden wie unter Abb. 4.24 durchgeführt. Mad1-GFP wurde mit 50% des 488 nm Lasers, Ndc80-3mCherry mit 80% und Spc42-3mCherry mit 75% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und repräsentative Nocodazol-arretierte Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 µm). Anschließend wurde die Co-Lokalisation von Mad1-GFP-Foci mit Ndc80 (A, n = 100) und Spc42 (B, n = 59) ausgewertet und in je einem Diagramm dargestellt.

Als Nächstes wurde das Mad1-GFP-Signal in asynchronen, Nocodazol-arretierten und Nocodazol-arretierten Zellen mit anschließender Cdc5-Überexpression untersucht. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Nocodazol (7,5 µg/ml) in der Metaphase arretiert und

anschließend zur Überexpression von Cdc5 die Hälfte der Kultur für 120 min mit 2% Galaktose induziert.

Die Auswertung der Mad1-Lokalisation zeigte, dass nach Nocodazol-Behandlung in über 80% der Zellen ein Kinetochor-Signal sichtbar war (Abb. 4.26 A und B). Interessanterweise war die Anzahl der Zellen mit Mad1-Kinetochor-Signal nach der Cdc5-Überexpression von 80% auf knapp 20% reduziert (Abb. 4.26 B). Bei konstitutiver Cdc5-Expression (*pTEF2*) war ebenfalls eine geringe Anzahl an Nocodazol-arretierten Zellen mit Mad1-Kinetochor-Signal zu sehen als bei Nocodazol-arretierten WT-Zellen (Abb. 4.26 B 3 h NOC und C). Dagegen war die Anzahl von Nocodazol-arretierten Zellen mit Mad1-Kinetochor-Signal bei konstitutiver Expression der kinaseinaktiven Mutante Cdc5K110M vergleichbar mit der von WT-Zellen (Abb. 4.26 C).

Daraus lässt sich schließen, dass erhöhte Mengen von Cdc5 Mad1 hindern am unbesetzten Kinetochor zu lokalisieren. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass durch Cdc5 die Mad1-Dissoziation vom Kinetochor induziert wurde.

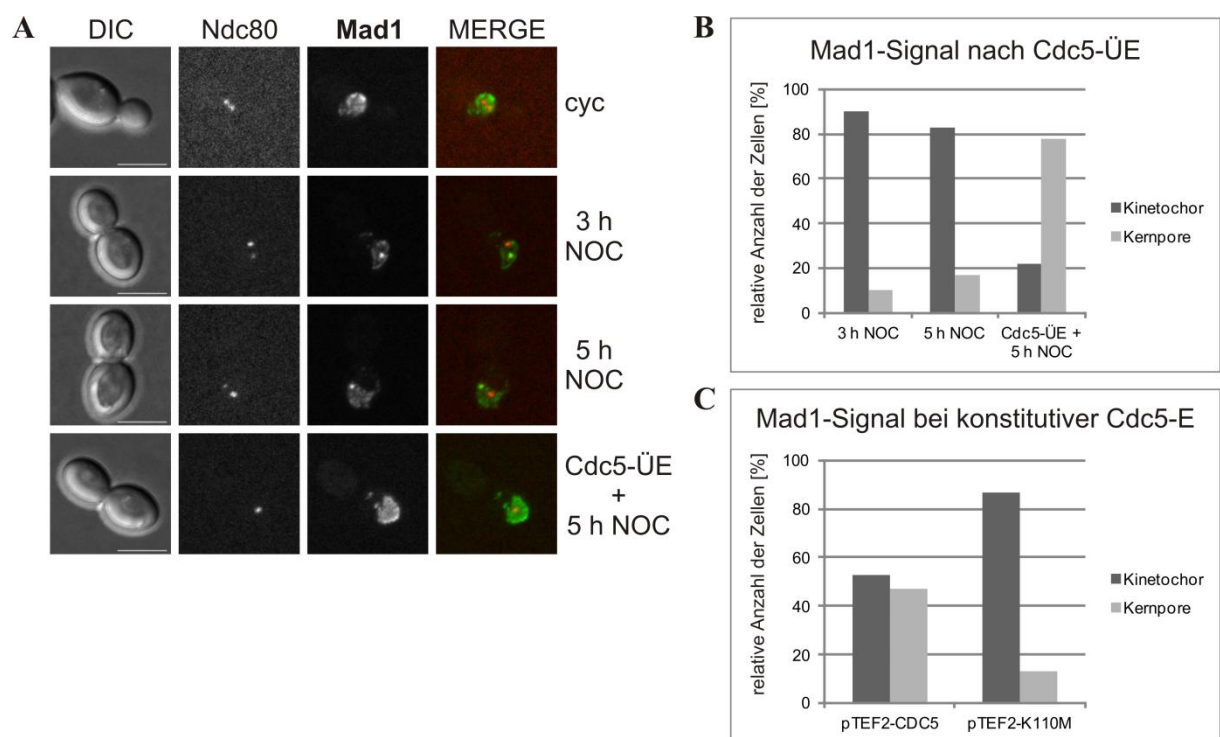


Abbildung 4.26 Überexpression von Cdc5 verringert die Kinetochor-Lokalisation von Mad1-GFP

(A) Die Zellen des Stammes W11440 (*MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*) wurden in XYR bei 25°C kultiviert und während der exponentiellen Wachstumsphase Nocodazol (7,5 µg/ml) zugegeben. Nach 3 stündigem Arrest wurde die Kultur geteilt und bei der einen Hälfte durch Zugabe von 2% Galaktose der *GAL1*-Promotor für 2 h induziert. Aus der asynchronen, der Nocodazol-arretierten (3 h und 5 h) und der Nocodazol-arretierten Kultur mit anschließender Cdc5-Überexpression wurden Zellen geerntet und mit SD++-Agarose für die Mikroskopie präpariert. Die mit

Galaktose inkubierten Zellen wurden mit SRG++-Agarose präpariert. Es wurden Z-Stapel mit 10 Ebenen und einer Distanz von 0,5 μm sowie einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Mad1-GFP wurde mit 50% des 488 nm Lasers und Ndc80-3mCherry mit 80% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und für die Zeitwerte repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 μm).

(B) Darstellung der Quantifizierung der Mad1-GFP-Signale nach Nocodazol-Behandlung (NOC) und Cdc5-Überexpression (ÜE, $n > 100$)

(C) Die Zellen der Stämme W12378 (*MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-CDC5-MYC9-LEU2*) und W12380 (*MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-cdc5K110M-MYC9-LEU2*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von Nocodazol (7,5 $\mu\text{g/ml}$) 3 h arretiert. Die Präparation der Zellen und die Aufnahmen am Mikroskop wurden wie unter A durchgeführt und anschließend das Mad1-GFP-Signal ausgewertet ($n > 48$) und in einem Diagramm dargestellt.

4.4.4.2 Erhöhte Mengen von Cdc5 verringern die Kinetochor-Lokalisation von Mad2 und Bub3

Da Mad1 für die Rekrutierung von Mad2 ans Kinetochor zuständig ist und Mad2 sowie Bub3 nach SAC-Aktivierung ebenfalls an den unbesetzten Kinetochoren lokalisieren (Iouk *et al.*, 2002; Kerscher *et al.*, 2003; Gillett *et al.*, 2004), lässt sich vermuten, dass die erhöhten Mengen von Cdc5 auch einen erheblichen Einfluss auf die Lokalisation des MCC haben könnten.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die Kinetochor-Signale von Mad2-GFP, Mad3-GFP und Bub3-GFP in asynchronen, Nocodazol-arretierten und Nocodazol-arretierten Zellen mit anschließender Cdc5-Überexpression untersucht.

In asynchronen Zellen lokalisierte Mad2 im Zytoplasma und im Zellkern. Dagegen lokalisierte Mad2 nach Aktivierung des Spindelkontrollsystems fast ausschließlich an den unbesetzten Kinetochoren (Abb. 4.27 A). Dabei hatten 71% der Zellen ein Kinetochor-Signal und 15% der Zellen zwei Mad2-Signale. Ebenso wie bei Mad1, überlagerte das Mad2-Kinetochor-Signal bei 96% der Zellen, die ein punktförmiges Mad2-Signal zeigten, mit dem schwachen Ndc80-Signal oder blieben ohne Ndc80-3mCherry (Daten nicht gezeigt).

Infolge der Überexpression von Cdc5 verschwand wie bei Mad1 das Kinetochor-Signal von Mad2-GFP. Von ca. 90% der Zellen mit Kinetochor-Signal sank der Anteil auf knapp 30% ab (Abb. 4.27 B). Zusätzlich behinderte auch die konstitutive Expression von Cdc5 die Lokalisation von Mad2 am Kinetochor. Nur 60% der Zellen wiesen ein Mad2-Kinetochor-Signal auf, im Gegensatz zu 80% der Zellen bei konstitutiver Expression der kinaseinaktiven Mutante Cdc5K110M (Abb. 4.27 C).

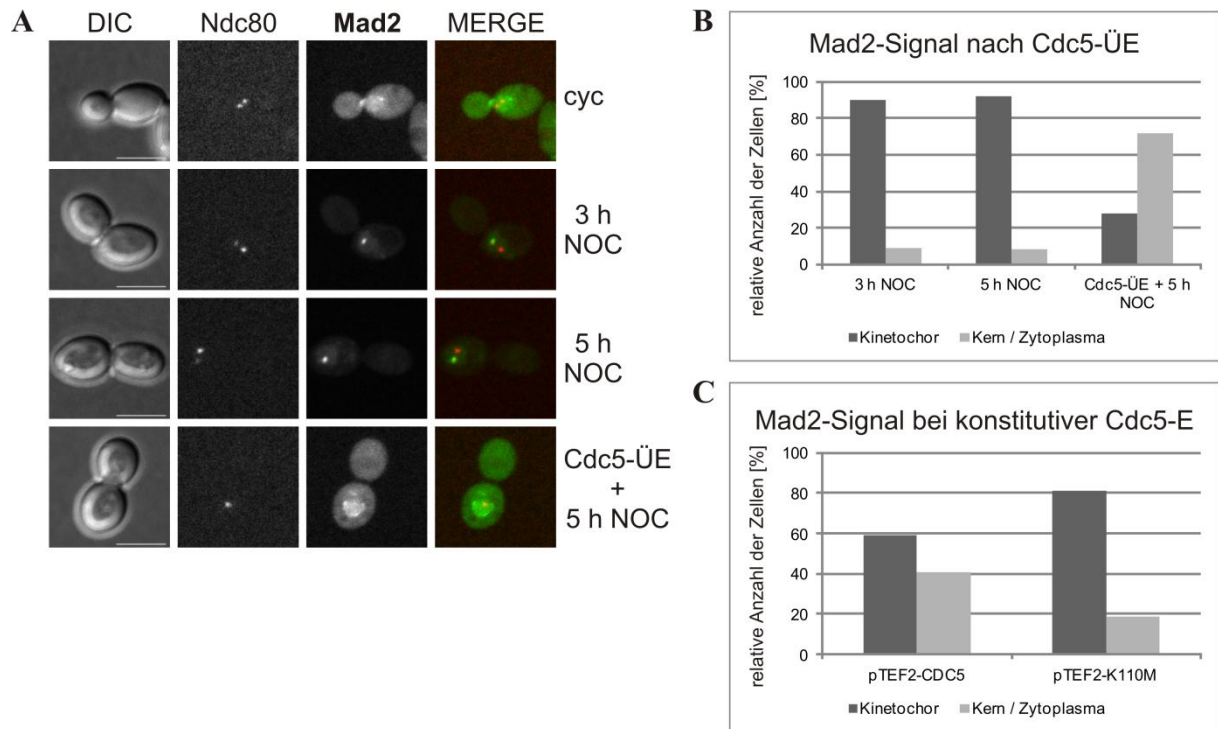


Abbildung 4.27 Mad2-Lokalisation am unbesetzten Kinetochor wird durch Cdc5-Überexpression reduziert

(A) Die Zellen des Stammes W11441 (*MAD2-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*) wurden wie unter Abb. 4.26 A kultiviert, präpariert und mikroskopiert. Mad2-GFP wurde mit 80% des 488 nm Lasers und Ndc80-3mCherry mit 80% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und für die Zeitwerte repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 µm).

(B) Darstellung der Quantifizierung der Mad2-GFP-Signale zu den angegebenen Zeitpunkten (n > 140).

(C) Die Zellen der Stämme W12374 (*MAD2-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-CDC5-MYC9-LEU2*) und W12376 (*MAD2-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-cdc5K110M-MYC9-LEU2*) wurden ebenfalls, wie in Abb. 4.26 C beschrieben, behandelt und anschließend das Mad2-GFP-Signal ausgezählt (n > 45) und in einem Diagramm dargestellt.

Neben Mad1 und Mad2 wurden auch Mad3 und Bub3 nach Nocodazol-Behandlung ans unbesetzte Kinetochor rekrutiert (Abb. 4.28). Während des Zellteilungszyklus lokalisierten Mad3 und Bub3 hauptsächlich im Zellkern. Da Bub3 vermutlich für den Aufbau der Spindel wichtig ist, lokalisiert Bub3 bereits ab der S-Phase bis zur frühen Metaphase, wenn die bipolare Anheftung der Mikrotubuli an die Kinetochore erfolgt ist, am Kinetochor. Die Aktivierung des SAC verstärkt die Bub3-Kinetochor-Lokalisation (Kerscher *et al.*, 2003; Gillett *et al.*, 2004). Allerdings waren die Auswirkungen der Cdc5-Überexpression auf die Lokalisation von Mad3 und Bub3 nicht so deutlich wie bei Mad1 und Mad2.

Die Mad3-Kinetochor-Signale waren nach drei Stunden Nocodazol-Inkubation nur sehr schwach zu sehen. Anders als bei den anderen Komponenten, erhöhte sich nach längerem Nocodazol-Arrest die Anzahl der Zellen mit Mad3-Kinetochor-Signal (Abb. 4.28 A). Interessanterweise nahm die Anzahl der Zellen mit Mad3-Kinetochor-Lokalisation nach Cdc5-Überexpression nicht wieder ab, sondern es traten mehr Zellen mit zwei Kinetochor-Signalen auf. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Kinetochor-Signale stärker wurden.

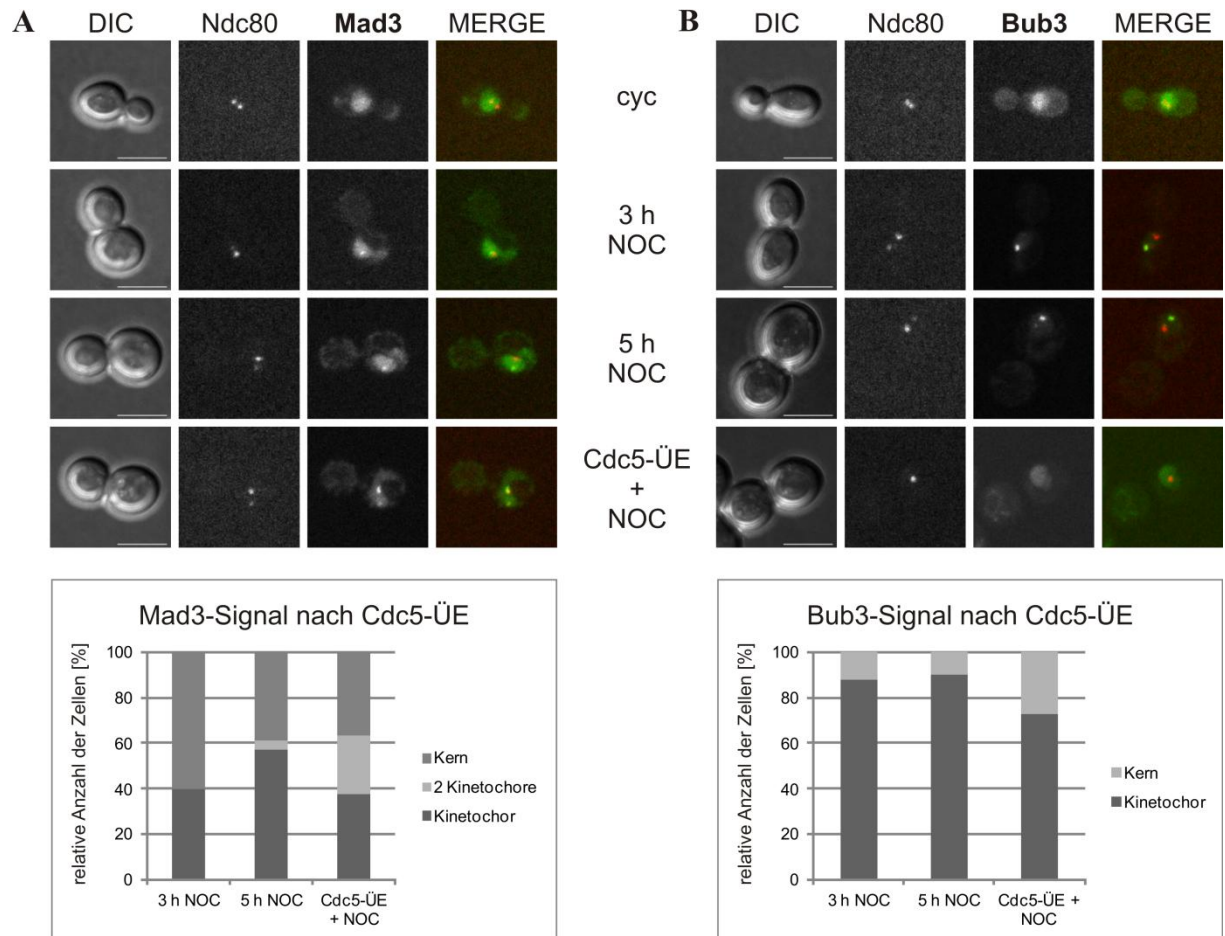


Abbildung 4.28 Kinetochor-Lokalisation von Mad3 und Bub3 im SAC nach Cdc5-Überexpression

Die Zellen der Stämme (A) W11837 (*MAD3-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*) und (B) W11838 (*BUB3-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*) wurden ebenfalls wie unter Abb. 4.26 A kultiviert, präpariert und mikroskopiert. Mad3-GFP wurde mit 100%, Bub3-GFP mit 80% des 488 nm Lasers und Ndc80-3mCherry mit 100% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und für die Zeitwerte repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 µm). Die Mad3-GFP- (A, n > 80) bzw. Bub3-GFP-Signale (B, n > 77) wurden anschließend zu den angegebenen Zeitpunkten ausgezählt und dargestellt.

Bei Bub3 konnten neben den Zellen mit einem starken Kinetochor-Signal auch teilweise Zellen mit schwachem und starkem Bub3-GFP detektiert werden. Dabei überlagerten das starke Bub3-GFP mit dem schwachen Ndc80-3mCherry und das schwache Bub3-GFP mit dem starken Ndc80-Signal (Abb. 4.28 B 5 h NOC). Die Überexpression von Cdc5 bewirkte im Fall von Bub3 wie bei Mad1 und Mad2 eine Reduktion der Anzahl der Zellen mit Kinetochor-Signal von ungefähr 90% auf 70% (Abb. 4.28 B). Zwar war die Abnahme nicht so deutlich wie bei Mad1 und Mad2, jedoch war bei 20% der Zellen mit Kinetochor-Signal das Bub3-Kinetochor-Signal nur noch schwach zu sehen.

Einerseits bestätigen diese Ergebnisse, dass nach SAC-Aktivierung neben Mad1 auch Mad2 und Bub3 am unbesetzten Kinetochor lokalisieren und andererseits konnte erstmals eine Mad3-Kinetochor-Lokalisation gezeigt werden. Zusätzlich lässt sich aus den Lokalisationsstudien schließen, dass Cdc5 die Lokalisation von Mad1, Mad2 und Bub3 aber nicht von Mad3 am unbesetzten Kinetochor verringert.

4.4.4.3 Cdc20 co-lokalisiert mit unbesetztem Kinetochor

Neben Mad2, Mad3 und Bub3 zählt auch Cdc20 zum MCC, der wiederum an den APC bindet, wodurch dieser inhibiert ist (Musacchio und Salmon, 2007). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob in Nocodazol-arretierten Zellen sowohl Cdc20 als auch der APC ebenfalls am unbesetzten Kinetochor zu sehen sind. Die APC-Untereinheit Cdc23 lokalisiert während des Zellzyklus im Zellkern und als nukleäre Foci, die durch SAC-Aktivierung verloren gehen (Jaquenoud *et al.*, 2002; Melloy und Holloway, 2004). Cdc20 lokalisiert während der Mitose ebenfalls im Nukleus (Shirayama *et al.*, 1998; Jaquenoud *et al.*, 2002).

Nach Aktivierung des Spindelkontrollsystems war bei Cdc23-GFP keine punktförmige Struktur zu sehen (Abb. 4.29 A). Dagegen wurde in Nocodazol-arretierten Zellen mit GFP-Cdc20 ein nukleäres, punktförmiges Signal, das mit dem schwachen Ndc80-Signal überlagerte, sichtbar (Abb. 4.29 B).

Die Mikroskopie-Daten zeigen, dass auch Cdc20 wie die restlichen MCC-Komponenten am unbesetzten Kinetochor lokalisiert. Dadurch wird vermutlich die Bildung des MCC ermöglicht. Dagegen findet die Inhibierung des APC durch den MCC womöglich nicht am Kinetochor statt, da Cdc23 nicht mit Ndc80 co-lokalisierte.

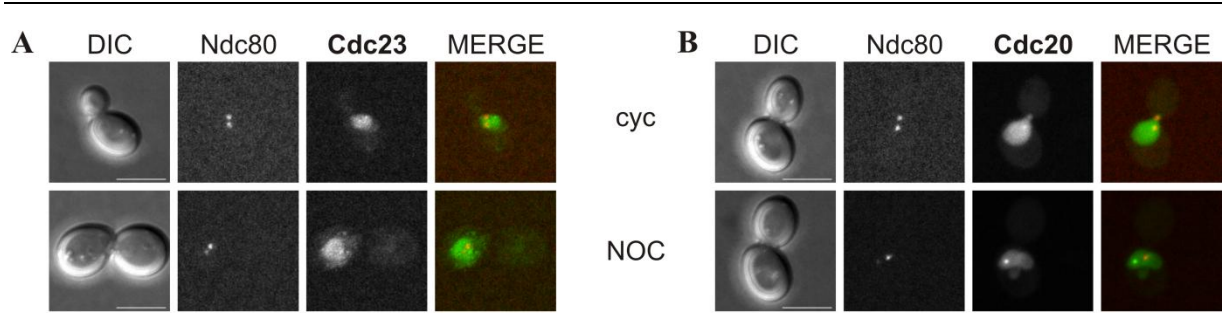


Abbildung 4.29 Cdc20 aber nicht Cdc23 co-lokalisiert mit unbesetztem Kinetochor

Die Zellen der Stämme (A) W12368 (*CDC23-GFP-HIS3MX6 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1*) und (B) W12245 (*ura3::pTEF2-GFP-MYC3-CDC20-tCYC1-URA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von Nocodazol (7,5 µg/ml) 3 h arretiert. Die Präparation der Zellen und die Aufnahmen am Mikroskop wurden erneut wie unter Abb. 4.24 durchgeführt. Cdc23-GFP wurde mit 50%, GFP-Cdc20 mit 40% des 488 nm Lasers und Ndc80-3mCherry mit 80% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und für die Zeitwerte repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 µm).

4.4.5 Kinetochor-Lokalisation von SAC-Komponenten ist voneinander abhängig

Um zu prüfen, inwieweit die Lokalisationen der einzelnen Komponenten des MCC voneinander abhängig sind, wurde die Kinetochor-Lokalisation von Mad1, Mad2, Bub3 und Mad3 in SAC- und *cdc20-Δ* Mutanten untersucht.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass in Nocodazol-arretierten Zellen sowohl die Mad2-Lokalisation am Kinetochor von Mad1 als auch die Mad1-Lokalisation von Mad2 abhängig ist (Iouk *et al.*, 2002; Gillett *et al.*, 2004). Die Mikroskopie-Daten dieser Arbeit zeigen zusätzlich, dass schon in asynchronen *mad1-Δ* Zellen Mad2-GFP nicht mehr im Zellkern akkumulierte, sondern über die gesamte Zelle verteilt war (Abb. 4.30). Dieses Ergebnis unterstreicht die Mad1-abhängige Lokalisation von Mad2 während des Zellzyklus.

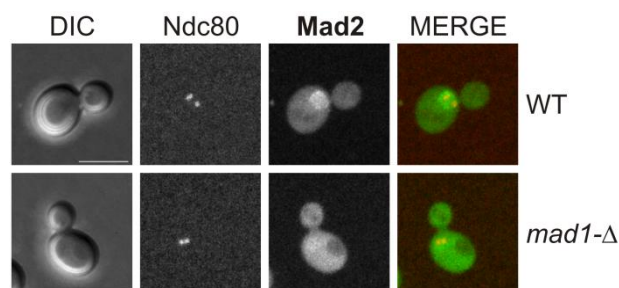


Abbildung 4.30 Mad2-GFP-Lokalisation in *mad1-Δ* Zellen

Die Zellen der Stämme W11897 (*MAD2-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2*) und W11899 (*mad1-Δ::kanMX4 MAD2-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von Nocodazol (20 µg/ml) 3 h

arretiert. Die Präparation der Zellen und die Aufnahmen am Mikroskop wurden wie unter Abb. 4.24 durchgeführt. Mad2-GFP wurde mit 80% des 488 nm Lasers und Ndc80-3mCherry mit 80% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 µm).

Darüber hinaus konnte anhand der Mikroskopie-Daten bestätigt werden, dass in Nocodazol-arretierten *mad1-Δ* Zellen Mad2-GFP nicht ans Kinetochor rekrutiert werden konnte, da keine Zellen mit Mad2-Kinetochor-Signal detektiert wurden (Abb. 4.31 B). Die Auswertung der Mad1-GFP-Signale in Nocodazol-behandelten *mad2-Δ* Zellen zeigte, dass auch die Mad1-Kinetochor-Lokalisation von Mad2 abhängig war, allerdings nicht ausschließlich wie Mad2 von Mad1 (Abb. 4.31 A). Die Lokalisation von Mad1 und Mad2 in *mad3-Δ* und *bub3-Δ* Zellen zeigte, dass Mad3 im Gegensatz zu Bub3 keinen Einfluss auf die Kinetochor-Lokalisation von Mad1 und Mad2 hatte, wodurch die Ergebnisse von Gillett *et al.* (2004) bestätigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Kinetochor-Lokalisationen von Mad1 und Mad2 von Cdc20 abhängig waren (Abb. 4.31 A und B). Dass sich die geringere Kinetochor-Lokalisation deutlicher bei Mad2 als bei Mad1 auswirkte, könnte an der stärkeren Mad1-Abhängigkeit von Mad2 liegen.

Im Gegensatz zu asynchronen Zellen, wie von Gillett *et al.* (2004) gezeigt, war die Bub3-Kinetochor-Lokalisation in Nocodazol-arretierten Zellen von Mad1 und Mad2 abhängig. Die Anzahl der *mad1-Δ* Zellen mit Bub3-Kinetochor-Signal war geringer als die von *mad2-Δ* Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Kinetochor-Lokalisation von Bub3 mehr von Mad1 als von Mad2 abhängig ist (Abb. 4.31 C).

Des Weiteren zeigte die Auswertung der Mad3-Signale, dass auch Mad3 abhängig von Mad1 und Mad2 in Nocodazol-arretierten Zellen am Kinetochor lokalisierte. Allerdings lokalisierte Mad3-GFP sowohl Mad1- als auch Mad2-abhängig am Kinetochor. Die Anzahl der *mad1-Δ* und *mad2-Δ* Zellen mit Mad3-Kinetochor-Signal war in etwa gleich (Abb. 4.31 D).

Zusammengefasst lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass die MCC-Komponenten Mad2, Mad3 und Bub3 in Nocodazol-arretierten Zellen alle Mad1-abhängig am Kinetochor lokalisieren und dass daher der Einfluss von Cdc5 auf den MCC mit der Lokalisation von Mad1 zusammenhängen könnte.

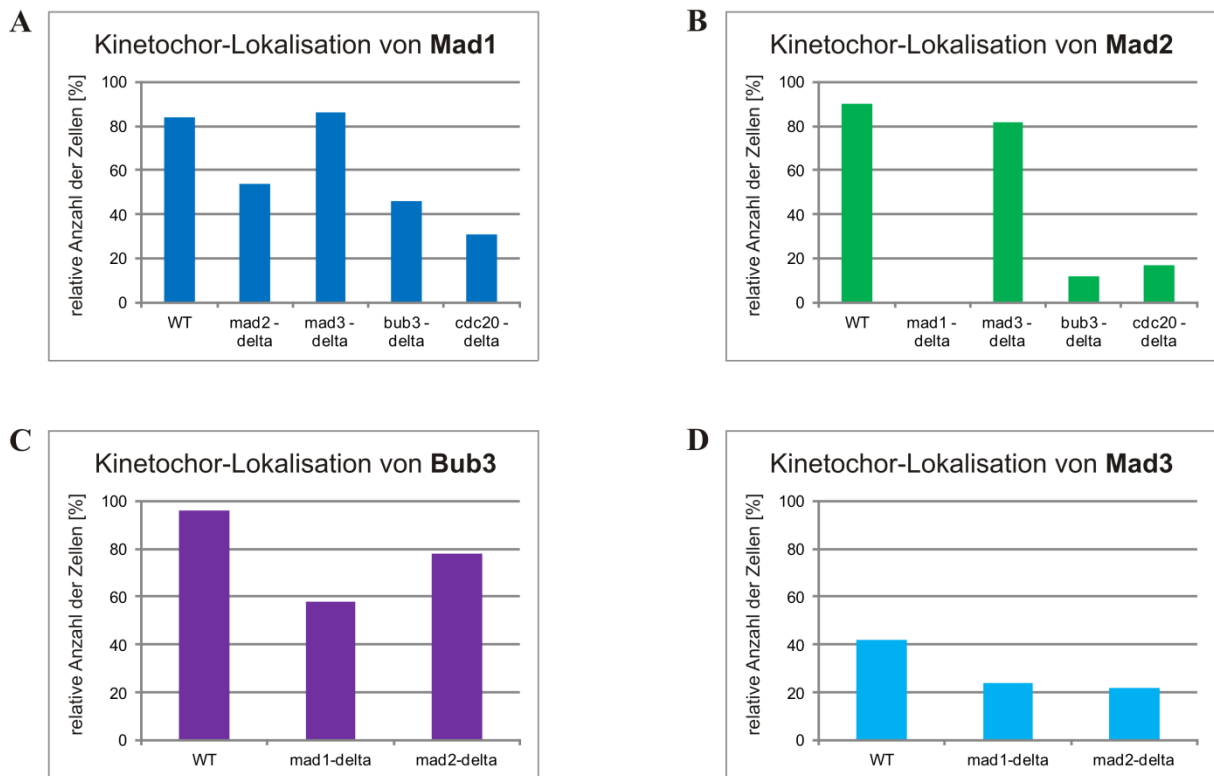


Abbildung 4.31 Kinetochor-Lokalisation von Mad1, Mad2, Bub3 und Mad3 in Abhängigkeit voneinander

(A) W11896 (*MAD1-GFP-CaURA3*), W11898 (*mad2-Δ::kanMX4 MAD1-GFP-CaURA3*), W12370 (*mad3-Δ::kanMX4 MAD1-GFP-CaURA3*), W12369 (*bub3-Δ::kanMX4 MAD1-GFP-CaURA3*), W12197 (*cdc20::natNT2-pGALL-CDC20 MAD1-GFP-CaURA3*)

(B) W11897 (*MAD2-GFP-CaURA3*), W11899 (*mad1-Δ::kanMX4 MAD2-GFP-CaURA3*), W12371 (*mad3-Δ::kanMX4 MAD2-GFP-CaURA3*), W12372 (*bub3-Δ::kanMX4 MAD2-GFP-CaURA3*), W12182 (*cdc20::natNT2-pGALL-CDC20 MAD2-GFP-CaURA3*)

(C) W12388 (*BUB3-GFP-CaURA3*), W12391 (*mad1-Δ::kanMX4 BUB3-GFP-CaURA3*), W12392 (*mad2-Δ::kanMX4 BUB3-GFP-CaURA3*)

(D) W12387 (*MAD3-GFP-CaURA3*), W12389 (*mad1-Δ::kanMX4 MAD3-GFP-CaURA3*), W12390 (*mad2-Δ::kanMX4 MAD3-GFP-CaURA3*)

Als Kinetochor-Marker enthielten die in A – D aufgeführten Stämme *NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2*.

Die Zellen der Stämme W12182 und W12197 wurden in XYRG bei 25°C angezogen, in ihrer exponentiellen Wachstumsphase in XYD gewaschen und anschließend 3 h in XYD inkubiert. Für die letzten 60 min wurde zusätzlich Nocodazol (20 µg/ml) zugegeben. Die Zellen der restlichen Stämme wurden in XYD bei 25°C kultiviert und während ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit Nocodazol (20 µg/ml) 3 h arretiert. Zur Präparation der Zellen für die Mikroskopie wurden sie auf einem Deckglas verteilt und mit SD++-Agarose bedeckt. Es wurden Z-Stapel mit 10 Ebenen und einer Distanz von 0,5 µm sowie einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Mad1-GFP wurde mit 50%, Mad2-GFP mit 80%, Bub3-GFP und Mad3-GFP mit 100% des 488 nm Lasers und Ndc80-3mCherry mit 80% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und anschließend die Kinetochor-Lokalisation anhand der bekannten Punktbildung von Mad1, Mad2, Mad3 und Bub3 ausgezählt (n = 50 bzw. *cdc20-Δ*: n > 85) und in Diagrammen dargestellt.

4.4.6 Potentielle Zielproteine von Cdc5 im Spindelkontrollsystem

Da Cdc5 sowohl die Interaktion von Cdc20 mit Mad2, Mad3 und Bub3 (siehe 4.4.2) als auch deren Lokalisation sowie die von Mad1 (siehe 4.4.4.1 und 4.4.4.2) beeinflussen kann, war die nächste Zielsetzung, mehr über die Wirkungsweise von Cdc5 im SAC zu erfahren und mögliche Zielproteine zu identifizieren. Eine Interaktion von Cdc5 mit Mad1, Mad2, Mad3 und Bub3 konnte mittels Co-Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt) und ist bislang auch nicht bekannt. Mad3 wird zwar Cdc5-abhängig phosphoryliert, jedoch beeinträchtigt diese nicht die Bindung an Cdc20 (Rancati *et al.*, 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mad3 für die Kinetochor-Lokalisation von Mad1 und Mad2 nicht notwendig ist (siehe 4.4.5). In der Literatur sind allerdings physische Interaktionen von Cdc5 mit den Kinetochor-Komponenten Ndc80 und Slk19 sowie mit Mps1 beschrieben (Snead *et al.*, 2007; Rahal und Amon, 2008), die somit als mögliche Substrate von Cdc5 in Frage kommen.

4.4.6.1 Ndc80

Ndc80 ist eine von vier Komponenten des Ndc80-Komplexes, der als Mikrotubuli-Bindestelle des Kinetochors dient (Cho *et al.*, 2010). Wie bereits unter 4.4.4 erwähnt, sind in Nocodazol-arretierten Zellen meistens ein starkes und ein schwaches Ndc80-Signal zu sehen. Um zu prüfen, ob Cdc5 einen Einfluss auf die Lokalisation von Ndc80 hat, wurde das Ndc80-GFP-Signal in asynchronen, Nocodazol-arretierten und Nocodazol-arretierten Zellen mit anschließender Cdc5-Überexpression untersucht.

Die Auswertung der Mikroskopie-Daten zeigte, dass in Nocodazol-arretierten Zellen etwa 60% der Zellen ein starkes und ein schwaches Ndc80-GFP-Signal aufwiesen. Durch die Überexpression von Cdc5 nahm die Anzahl der Zellen mit starkem und schwachem Ndc80-Signal deutlich ab. Interessanterweise stieg dagegen durch die Überexpression die Anzahl der Zellen mit einem starken bzw. mit zwei starken Ndc80-Signalen an (Abb. 4.32).

Neben der Lokalisation wurde auch die Mobilität von Ndc80 untersucht, allerdings zeigte sich dabei kein Einfluss von Cdc5 auf das Laufverhalten von Ndc80 in der SDS-PAGE (Daten nicht gezeigt).

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich eine direkte Wirkung von Cdc5 auf Ndc80 nicht ausschließen. Sie lassen allerdings vermuten, dass Cdc5 trotz Nocodazol die Bildung der Mikrotubuli unterstützt, da die Anzahl der Zellen mit unbesetztem Kinetochor reduziert war.

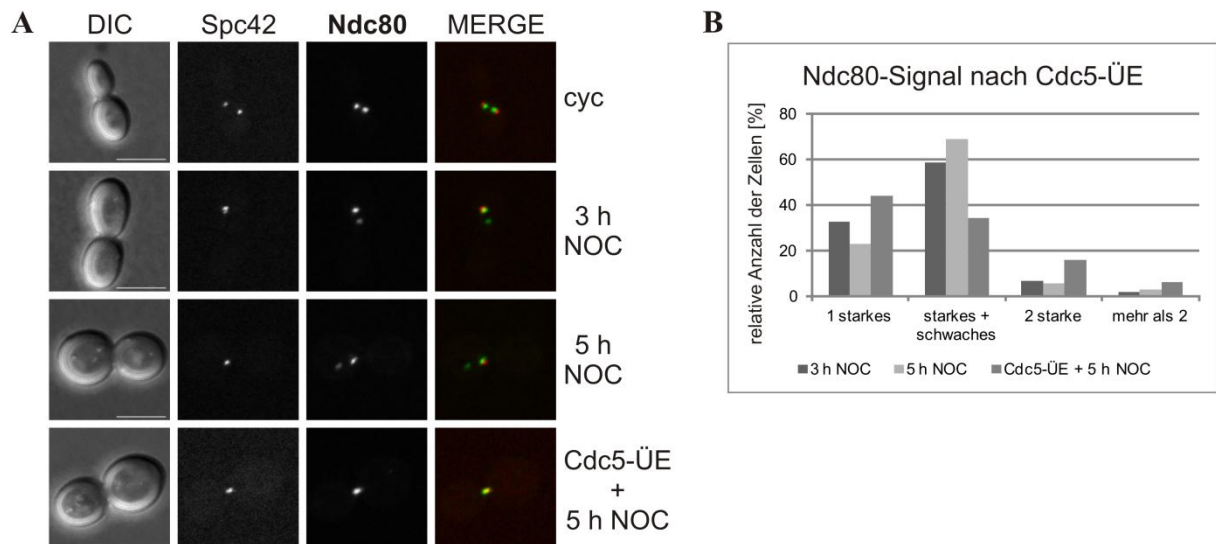


Abbildung 4.32 Überexpression von Cdc5 reduziert die Anzahl der Zellen mit unbesetztem Kinetochor

(A) Die Zellen des Stammes W12243 (*NDC80-GFP-tCYC1-URA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*) wurden wie unter Abb. 4.26 A beschrieben kultiviert, präpariert und mikroskopiert. Ndc80-GFP wurde mit 80% des 488 nm Lasers und Spc42-3mCherry mit 80% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und für die Zeitwerte repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 µm).

(B) Das Ndc80-GFP-Signal wurde zu den angegebenen Zeitpunkten ausgewertet (n > 32) und dargestellt.

4.4.6.2 Slk19

Neben der Beteiligung am FEAR-Signalweg, ist Slk19 am Aufbau sowie der Elongation der Spindel beteiligt (Stegmeier *et al.*, 2002; Sullivan und Uhlmann, 2003; Havens *et al.*, 2010). Slk19 stabilisiert das Plus-Ende von Mikrotubuli und lokalisiert während des Zellteilungszyklus am Kinetochor sowie zusätzlich in der Anaphase in der *spindle midzone* (Abb. 4.33 A cyc; Zeng *et al.*, 1999). Die Lokalisation von Slk19 am Kinetochor ist von den beiden Kinetochor-Komplexen Ndc80 und Spc105 abhängig (Pagliuca *et al.*, 2009).

Um einen Einfluss von Cdc5 auf Slk19 zu untersuchen, wurde zunächst die Kinetochor-Lokalisation von Slk19-GFP nach SAC-Aktivierung und anschließend nach zusätzlicher Cdc5-Überexpression analysiert. Dazu wurden die Zellen mit Nocodazol (7,5 µg/ml) in der Metaphase arretiert und zur Visualisierung der Kinetochore Ndc80-3mCherry verwendet.

Die Mikroskopie-Daten zeigten, dass Nocodazol-arretierte Zellen im Gegensatz zu asynchronen Zellen hauptsächlich ein Slk19-Kinetochor-Signal aufwiesen (82%) und dass überraschenderweise davon knapp 60% mit dem schwachen Ndc80-3mCherry überlagerten bzw. ohne Ndc80-Signal blieben (n = 35, Abb. 4.33 A). Zusätzlich konnte bei 15% der Nocodazol-arretierten Zellen ein starkes und ein schwaches Signal von Slk19-GFP festgestellt

werden, wovon das schwache Slk19-GFP mit dem starken Ndc80-Signal und das starke Slk19-GFP mit dem schwachen Ndc80-Signal co-lokalisierte. Die Überexpression von Cdc5 hatte zur Folge, dass deutlich weniger Zellen ein starkes Slk19-Signal zeigten, aber mehr Zellen mit zwei starken Signalen vorhanden waren (Abb. 4.33 B).

Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass Cdc5 die Bildung der Mikrotubuli fördert, da ähnlich wie bei Ndc80 zwei starke Slk19-Signale auftreten.

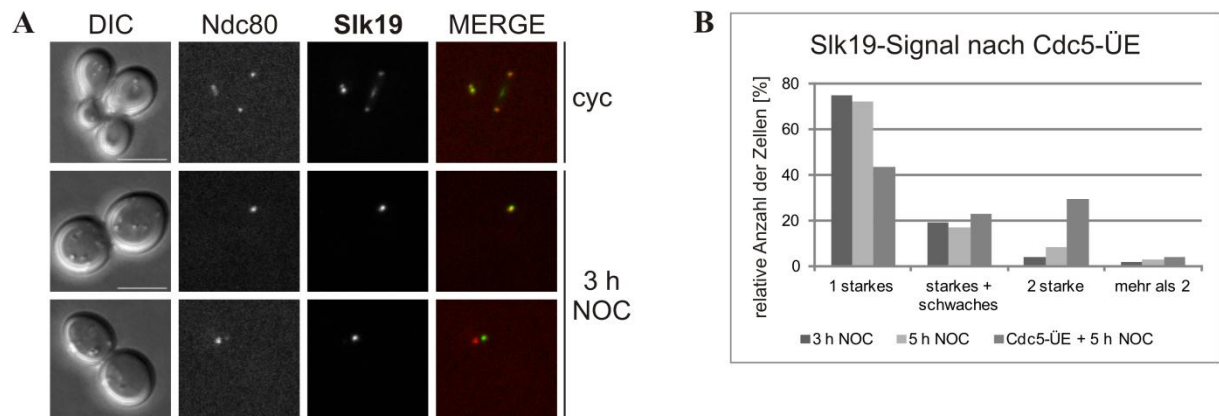


Abbildung 4.33 Slk19-Lokalisation wird durch Cdc5-Überexpression beeinflusst

(A) Die Zellen des Stammes W12386 (*SLK19-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und während ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit Nocodazol (7,5 µg/ml) 3 h arretiert. Die Präparation der Zellen und die Aufnahmen am Mikroskop wurden wie unter Abb. 4.24 beschrieben durchgeführt. Slk19-GFP wurde mit 20% des 488 nm Lasers und Ndc80-3mCherry mit 80% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und für die Zeitwerte repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 µm).

(B) Die Zellen des Stammes W12238 (*SLK19-GFP-CaURA3 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*) wurden wie unter Abb. 4.26 A beschrieben kultiviert, präpariert und mikroskopiert. Slk19-GFP wurde mit 20% des 488 nm Lasers detektiert und die aufgenommenen Z-Stapel mit der Software Axio Vision projiziert. Anschließend wurden die Slk19-Signale ausgewertet (n > 35) und in einem Diagramm dargestellt.

Zusätzlich zur Slk19-Lokalisation wurde die Mad1-Kinetochor-Lokalisation nach Aktivierung des Spindelkontrollsystems und Induktion der Cdc5-Überexpression in *slk19-Δ* Mutanten analysiert. Die Auswertung der Mikroskopie-Daten zeigte, dass bei der *slk19-Δ* Mutante etwa 20% weniger Zellen eine Mad1-Kinetochor-Lokalisation aufwiesen als Wildtyp-Zellen. Wohingegen die Abnahme der Anzahl der Zellen mit Mad1-Kinetochor-Signal nach Cdc5-Überexpression in der *slk19-Δ* Mutante schwächer war als in WT-Zellen (Abb. 4.34).

Zusammengefasst lässt sich daraus schließen, dass Slk19 einen gewissen Beitrag zur Lokalisation von Mad1 am unbesetzten Kinetochor leistet, aber nicht zwingend erforderlich ist. Die Wirkung von Cdc5 auf die Mad1-Kinetochor-Lokalisation wird durch *slk19-Δ*

abgeschwächt. Ob Slk19 als direktes Zielprotein von Cdc5 im SAC in Frage kommt, kann anhand dieser Daten nicht eindeutig geklärt werden.

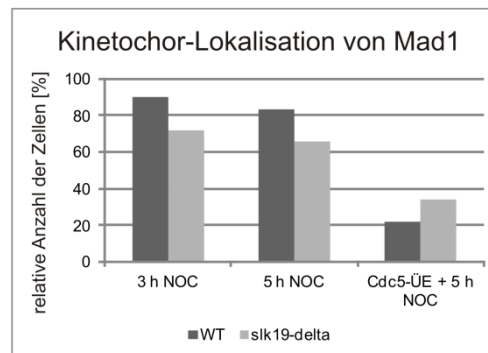


Abbildung 4.34 Slk19 trägt zur Lokalisation von Mad1 am unbesetzten Kinetochor bei

Die Zellen des Stammes W12188 (*MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3 slk19-Δ::HIS3MX6*) wurden wie unter Abb. 4.26 A beschrieben kultiviert, präpariert und mikroskopiert. Die Mad1-GFP-Kinetochor-Signale in *slk19-Δ* Zellen (n = 100) wurden ausgezählt und im Vergleich zu W11440 (siehe Abb. 4.26 A) dargestellt.

4.4.6.3 Mps1

Mps1 ist ein essentieller Regulator des SAC und für die Rekrutierung einiger SAC-Komponenten an das Kinetochor wie z. B. Mad1 notwendig (Kim und Yu, 2011; Liu und Winey, 2012). Die Überexpression von Mps1 führt unabhängig von unbesetzten Kinetochoren zur Aktivierung des Spindelkontrollsystems (Hardwick *et al.*, 1996).

Um einen Einfluss von Cdc5 auf die Funktion von Mps1 zu untersuchen, wurde zunächst die Fähigkeit von Mps1 getestet, bei erhöhten Cdc5-Mengen den SAC zu aktivieren. Dazu wurde von Zellen mit *MPS1* unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors und *CDC5* unter der Kontrolle des *pTEF2*-Promotors zum einen das Wachstum auf Agarplatten mit Galaktose und zum anderen der Anteil der arretierten Zellen in der M-Phase nach Induktion des *GAL1*-Promotors bestimmt.

Der Wachstumstest zeigte, dass Zellen durch die Induktion der Mps1-Überexpression im Vergleich zu Wildtyp schlechter wuchsen (vgl. Abb. 4.35 A 2 und 3 mit 1 und 8). Dagegen hatte die konstitutive Expression von Cdc5 bzw. der Kinase-inaktiven Mutante Cdc5K110M keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen (Abb. 4.35 A 5 und 7). Interessanterweise war das Wachstum der Zellen, die zusätzlich zur Mps1-Überexpression eine konstitutive Expression von Cdc5 aufwiesen, weniger beeinträchtigt (vgl. Abb. 4.35 A 4 mit 2 und 3). Im Gegensatz dazu wuchsen die Zellen mit gleichzeitiger Überexpression von Mps1 und Cdc5K110M genau so schlecht wie die mit Mps1-Überexpression alleine (vgl. Abb. 4.35 A 6

mit 2 und 3). Daraus lässt sich schließen, dass erhöhte Mengen von Cdc5 der Überexpression von Mps1 entgegenwirken.

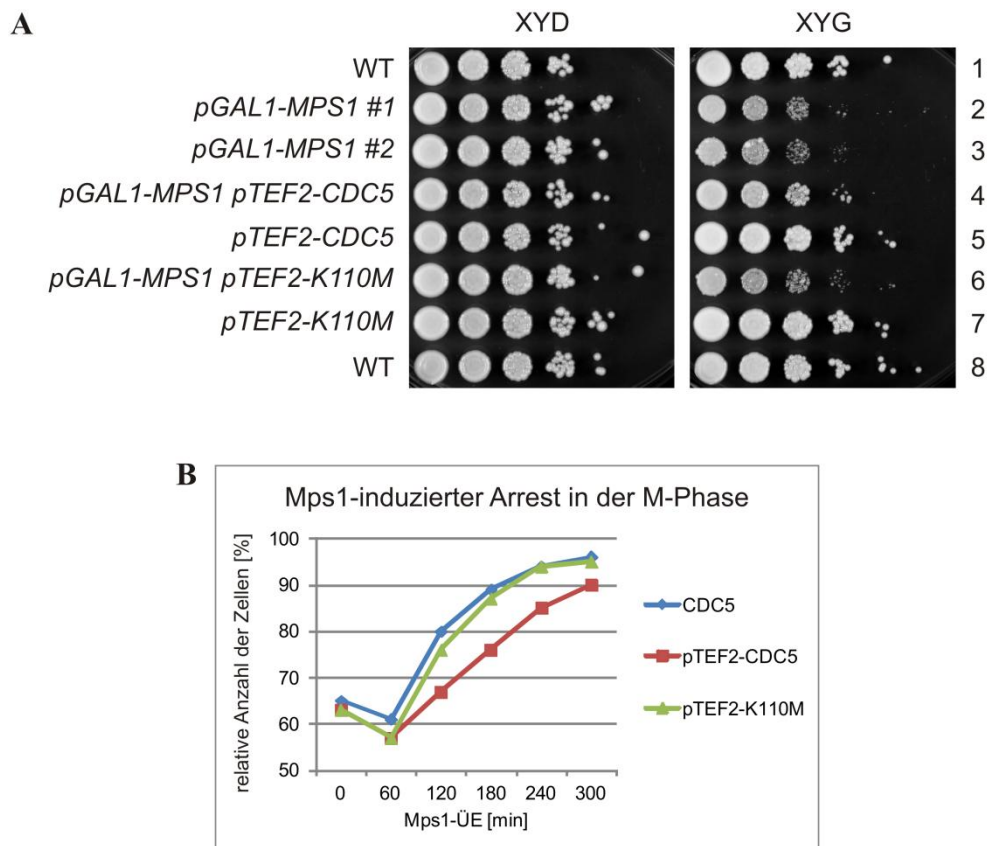


Abbildung 4.35 Cdc5-Überexpression wirkt der Mps1-Überexpression entgegen

(A) Um das Wachstum der Stämme 1/8: K699 (WT), 2: W8425 (*his3::pGAL1-FLAG3-MPS1-tCYC1-HIS3*), 3: W11840 (*his3::pGAL1-FLAG3-MPS1-tCYC1-HIS3*), 4: W12377 (*his3::pGAL1-FLAG3-MPS1-tCYC1-HIS3 leu2::pTEF2-CDC5-MYC9-LEU2*), 5: W12378 (*leu2::pTEF2-CDC5-MYC9-LEU2*), 6: W12379 (*his3::pGAL1-FLAG3-MPS1-tCYC1-HIS3 leu2::pTEF2-cdc5K110M-MYC9-LEU2*), 7: W12380 (*leu2::pTEF2-cdc5K110M-MYC9-LEU2*) zu testen, wurden die Zellen über Nacht bei 25°C kultiviert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen ausgehend von 1 OD₆₀₀/ml in 1:10er Schritten bis 1 x 10⁻⁵ OD₆₀₀/ml hergestellt. Mittels Frogger wurden die Zellen auf eine XYD- und eine XYG-Platte aufgebracht und 2 (XYD) bzw. 3 Tage (XYG) bei 25°C inkubiert.

(B) Für die Bestimmung des DNA-Gehalts wurden die Zellen der Stämme W11840, W12377 und W12379 in XYR bei 25°C kultiviert und während ihrer exponentiellen Wachstumsphase der *GAL1*-Promotor mit 2% Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen mit 70% Ethanol fixiert. Die DNA wurde mit Sytox Green gefärbt und der DNA-Gehalt der Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Der Anteil der Zellen mit 2C-DNA-Gehalt wurde mit Hilfe der Software FCS Express 4 ermittelt und ist im Diagramm dargestellt (n > 19000).

Anhand der Bestimmung der Anzahl der nach Induktion der Mps1-Überexpression arretierten Zellen konnte diese Vermutung bestätigt werden. Wildtyp-Zellen arretieren nach ca. 180 min

Mps1-Überexpression nahezu vollständig in der M-Phase. Es befanden sich etwa 90% der Zellen im Metaphase-Arrest (Abb. 4.35 B). Gleichmaßen verlief der M-Phase-Arrest in Zellen mit konstitutiver Cdc5K110M-Expression. Auch hier waren nach 180 min Induktion etwa 90% der Zellen arretiert. Dagegen arretierten Zellen mit konstitutiver Cdc5-Expression langsamer in der M-Phase. Nach 180 min Mps1-Überexpression befanden sich erst etwa 75% der Zellen mit erhöhter Cdc5-Menge in der M-Phase (Abb. 4.35 B).

Da Cdc5 vermutlich Mps1 entgegenwirkt, wurde Mps1 als potentiell Zielprotein von Cdc5 untersucht. Mittels Westernblot wurde eine mögliche direkte Phosphorylierung von Mps1 durch Cdc5 analysiert. Dazu wurden die Zellen in der M-Phase durch Zugabe von Nocodazol (7,5 µg/ml) arretiert, dann die Überexpression von Cdc5 mit 2% Galaktose induziert und alle 30 min Proben geerntet.

Es ist beschrieben, dass Mps1 durch Autophosphorylierung aktiviert wird (Liu und Winey, 2012). Dennoch war Mps1 in Nocodazol-arretierten WT-Zellen als eine scharfe Bande nachzuweisen (Abb. 4.36 A). Nach 60 min Überexpression von Cdc5 wurde eine weitere, wenn auch schwache Bande oberhalb der starken Bande von Mps1 sichtbar (Abb. 4.36 B Pfeil). Nach 120 min Induktion war diese Bande kaum noch zu detektieren. Allerdings nahm zu diesem Zeitpunkt sowohl das Cdc5-Signal als auch das starke Mps1-Signal etwas ab.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Mps1 ein potentiell Zielprotein von Cdc5 im Spindelkontrollsystem ist und Cdc5 Mps1 entgegenwirkt.

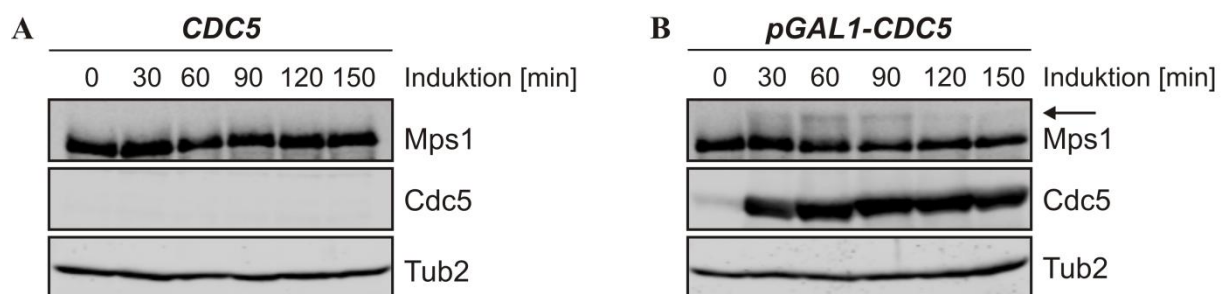


Abbildung 4.36 Mps1 ist ein potentiell Zielprotein von Cdc5

Die Zellen der Stämme (A) W12366 (*MPS1-MYC13-HIS3MX6*) und W12193 (*MPS1-MYC13-HIS3MX6 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3*) wurden in XYR bei 25°C kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe von Nocodazol (7,5 µg/ml) 3 h arretiert. Der vollständige Arrest der Zellen in der M-Phase wurde überprüft und anschließend durch Zugabe von 2% Galaktose der *GAL1*-Promotor induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die nachfolgende Westernblot-Analyse geerntet und aufgearbeitet. Der Nachweis von Mps1 erfolgte über sein C-terminales MYC13-Epitop mit dem α -myc-Antikörper 9E10 und Cdc5 über sein N-terminales FLAG3-Epitop mit dem α -flag-Antikörper M2. Tub2 wurde mittels α -Tub2-Serum detektiert und diente dabei als Ladekontrolle.

4.4.7 Regulation von Cdc5 im Spindelkontrollsystem

Da erhöhte Mengen von Cdc5 die Aufrechterhaltung des SAC stören, wirft dies die Frage auf, ob und wodurch die Aktivität von Cdc5 während des SAC reguliert wird. Die Aktivität von Cdc5 wird unter anderem durch regulierte Expression sowie Ubiquitin-vermittelte Degradation kontrolliert (Archambault und Glover, 2009). Aus diesem Grund wurden die Expression und die Stabilität von Cdc5 in Nocodazol-arretierten Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen zunächst in der G1-Phase synchronisiert und anschließend durch Zugabe von Nocodazol (7,5 µg/ml) in den M-Phase-Arrest entlassen. Nach 80 min wurde zu einer Hälfte der Kultur zusätzlich Cycloheximid (CHX, 100 µg/ml) zugegeben. CHX hemmt die Proteinneusynthese (Obrig *et al.*, 1971), wodurch eine mögliche Degradation von Cdc5 detektiert werden kann. Anschließend wurden die Proteinlevel von Cdc5 und Clb2 mittels Westernblot-Analyse verfolgt.

Ohne Zugabe von CHX akkumulierte Cdc5, wohingegen der Proteinlevel in Anwesenheit von CHX konstant blieb (Abb. 4.37 A). Gleiches galt auch für die Proteinlevel von Clb2.

Daraus lässt sich schließen, dass Cdc5 in Nocodazol-arretierten Zellen stabil ist und dass die Aktivität von Cdc5 im SAC nicht über die Expression oder die Proteolyse reguliert wird.

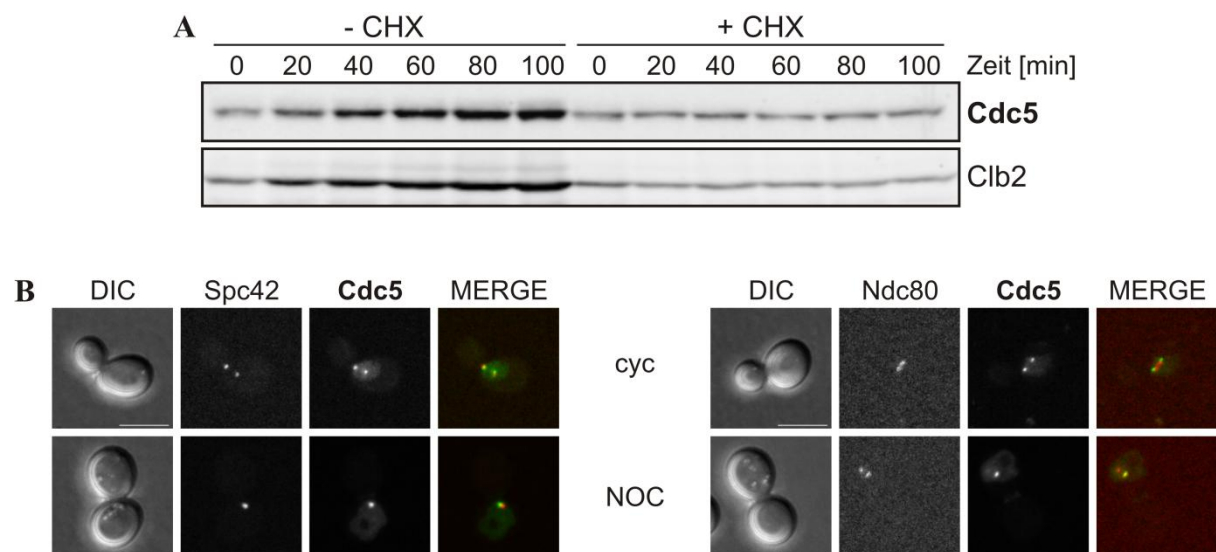


Abbildung 4.37 Cdc5 ist in Nocodazol-arretierten Zellen stabil und co-lokalisiert nicht mit dem unbesetzten Kinetochor

(A) Die Zellen des Stammes W1301 (*MATa bar1-Δ::HIS3*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und während ihrer exponentiellen Wachstumsphase durch Zugabe des Paarungspheromons α -Faktor (50 ng/µl) in der G1-Phase arretiert. Nach 3 h Arrest wurden die Zellen in frisches Medium mit Nocodazol (7,5 µg/ml) umgesetzt und weiter bei 25°C inkubiert. 80 min nach dem Entlassen der Zellen aus dem G1-Phase-Arrest wurde der 0-Wert geerntet und die restliche Kultur auf zwei Kolben aufgeteilt. Um die Proteinneusynthese zu hemmen, wurde zu der einen Hälfte Cycloheximid (100 µg/ml) gegeben und die andere Hälfte als Kontrolle ohne CHX

weiter inkubiert. Alle 20 min wurden Zellen geerntet und für die nachfolgende Westernblot-Analyse aufgearbeitet. Der Nachweis von Cdc5 und Clb2 erfolgte mit Hilfe des α -Cdc5- bzw. α -Clb2-Serums.

(B) Die Zellen der Stämme W10535 (*CDC5-GFP-CaURA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1*) und W12494 (*CDC5-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2*) wurden in XYD bei 25°C angezogen und während ihrer exponentiellen Wachstumsphase mit Nocodazol (7,5 μ g/ml) 3 h arretiert. Die Präparation der Zellen und die Aufnahmen am Mikroskop wurden wie unter Abb. 4.24 beschrieben durchgeführt. Cdc5-GFP wurde mit 60% des 488 nm Lasers und Spc42-3mCherry sowie Ndc80-3mCherry mit 80% des 561 nm Lasers detektiert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden mit der Software Axio Vision projiziert und für die Zeitwerte repräsentative Zellen dargestellt (Maßstabsbalken = 5 μ m).

Möglicherweise wird die Cdc5-Aktivität über die Lokalisation innerhalb der Zelle reguliert. In humanen Zellen lokalisiert Plk1 in der Prometaphase am Kinetochor (Arnaud *et al.*, 1998). Dagegen ist eine Kinetochor-Lokalisation von Cdc5 in *S. cerevisiae* nicht bekannt. Mit Hilfe von Spc42-3mCherry und Ndc80-3mCherry zur Visualisierung des SPK und des Kinetochors, wurde die Lokalisation von Cdc5-GFP in Nocodazol-arretierten Zellen analysiert.

In Abbildung 4.37 B ist gezeigt, dass Cdc5 sowohl in asynchronen (cyc) wie in Nocodazol-arretierten Zellen (NOC) im Kern und am SPK lokalisierte. Zusätzlich zeigte die Co-Lokalisation von Cdc5-GFP mit Ndc80-3mCherry, dass das Cdc5-Signal in Nocodazol-arretierten Zellen mit dem starken Ndc80-Signal, das auch mit dem SPK co-lokalisiert (siehe Abb. 4.24), überlagerte. Eine Co-Lokalisation von Cdc5-GFP mit dem schwachen Ndc80-3mCherry, dem unbesetzten Kinetochor, konnte nicht detektiert werden. Da der MCC im Gegensatz zu Cdc5 an den unbesetzten Kinetochoren lokalisiert, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Aktivität von Cdc5 im SAC über dessen Lokalisation reguliert wird.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass Cdc5 zur Inaktivierung des SAC beiträgt, da einerseits die Interaktion von Cdc20 mit den MCC-Komponenten und andererseits die Lokalisation von Mad1 am unbesetzten Kinetochor durch erhöhte Mengen von Cdc5 verringert wurden. Als mögliches Zielprotein konnte Mps1 identifiziert werden, dem Cdc5 entgegenwirkt. Außerdem scheint Slk19 zur Lokalisation von Mad1 am unbesetzten Kinetochor beizutragen. Die präzisen Zielproteine von Cdc5 konnten allerdings noch nicht bestimmt werden.

5 Diskussion

Die Polo-Kinasen sind in Eukaryoten stark konserviert und maßgeblich am Fortschreiten des Zellteilungszyklus beteiligt (Archambault und Glover, 2009). Ihre Multi-Funktionalität macht sie zu wichtigen Regulatoren des Zellzyklus. Eine strenge Regulation ihrer Aktivität ist für einen akkuraten Ablauf des Zellteilungszyklus erforderlich. Die Aktivität der Polo-Kinasen wird sowohl zeitlich als auch räumlich reguliert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Cdc5, die Polo-Kinase in *S. cerevisiae*, durch die N-terminale Domäne sowohl negativ als auch positiv reguliert wird. Einerseits vermittelt der N-terminale Bereich die Instabilität von Cdc5 und andererseits sind die Konsensussequenzen für die Cdk1-Phosphorylierung im N-terminalen Bereich wichtig für die biologische Funktion von Cdc5. Zusätzlich zu den bekannten positiven Funktionen von Cdc5 während der Mitose konnte Cdc5 in dieser Arbeit als negativer Regulator des Spindelkontrollsystems identifiziert werden. Zur Aufklärung der direkten Zielproteine von Cdc5 bedarf es allerdings weiterer Analysen.

5.1 Regulation von Cdc5 durch die N-terminale Domäne (N80)

Die Aktivität von Cdc5 und vielen weiteren Zellzyklus-Regulatoren wird durch verschiedene Mechanismen während des Zellteilungszyklus reguliert. Der Proteinlevel von Cdc5 wie auch der von Cdc20 und Clb2 fluktuiert aufgrund von zellzyklusregulierter Transkription und Ubiquitin-vermittelter Proteolyse. Wie bei Cdc5 trägt auch häufig die Phosphorylierung der Regulatoren zur zeitlichen Kontrolle der Aktivität bei. Zellzyklusabhängige Lokalisation in unterschiedlichen Zellkompartimenten vermittelt zusätzlich eine räumliche Regulation der biologischen Funktion.

5.1.1 N80 vermittelt Instabilität und Kernlokalisation

CDC5 gehört wie *CDC20*, *CLB2* und ca. 30 weitere Gene zum *CLB2*-Gencluster, das ab dem Ende der S-Phase bis zur Trennung des Zellkerns in der Mitose transkribiert wird (Enserink und Kolodner, 2010). Am Ende der Mitose und in der G1-Phase wird Cdc5 APC^{Hct1}-vermittelt degradiert. Für die Instabilität von Cdc5 ist der N-terminale Bereich notwendig, da die Deletion der 72 N-terminalen Aminosäuren Cdc5 stabilisiert (Charles *et al.*, 1998; Shirayama *et al.*, 1998; Arnold, 2008). Die Stabilisierung von Cdc5ΔN ist sowohl in G1-arretierten Zellen als auch im Verlauf des Zellteilungszyklus zu sehen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cdc5ΔN nicht mehr in der Lage war, zellzyklusabhängig zu fluktuieren

(siehe Abb. 4.1). Bislang gelten die beiden D-Boxen im N-terminalen Bereich als die relevanten Abbausignale in Cdc5 (Charles *et al.*, 1998). Die N-terminale Domäne von Cdc5 enthält zusätzlich eine potentielle KEN-Box (Michael *et al.*, 2008). Da die Mutation der D-Boxen nur eine marginale Stabilisierung in der G1-Phase bewirkt, warf dies die Frage auf, wie die Instabilität von Cdc5 durch die N-terminale Region genau reguliert wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der N-terminale Bereich (N80) von Cdc5 an GFP fusioniert und die Instabilität des Fusionsproteins analysiert. Dabei zeigte sich anhand von *live-cell imaging* und Westernblot-Analysen, dass der N-terminale Bereich von Cdc5 nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für die Instabilität in G1 war. Cdc5N80-GFP fluktuierte während des Zellteilungszyklus wie Cdc5 und die Degradation wurde durch APC^{Hct1} vermittelt (siehe Abb. 4.3 und 4.4). Zusätzlich zu den Ergebnissen zur Instabilität zeigten die Mikroskopie-Daten von Cdc5N80-GFP, dass der N-terminale Bereich von Cdc5 auch hinreichend für die Lokalisation im Zellkern war. Das Fusionsprotein lokalisierte ausschließlich im Zellkern, im Gegensatz zu GFP, das überwiegend im Zytoplasma akkumulierte (siehe Abb. 4.3 und 4.5). Diese Ergebnisse zeigen, dass die N-terminale Domäne von Cdc5 neben den Degradationssignalen eine NLS beinhaltet.

Im Gegensatz zu den bisherigen Vermutungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die KEN-Box das entscheidende Degron im N-terminalen Bereich von Cdc5 ist. Die Mutation von K35A und E36A stabilisierte Cdc5N80-GFP während der G1-Phase, wobei die Kernlokalisation nicht beeinflusst war (siehe Abb. 4.4 und 4.5). Dagegen tragen die beiden vermeintlichen D-Boxen nur indirekt zur Instabilität bei. Zwar hatte die Mutation der D-Boxen eine Stabilisierung von Cdc5N80-GFP in der G1-Phase zur Folge, aber zusätzlich führte die Mutation zur Fehllokalisation des Fusionsproteins ins Zytoplasma (siehe Abb. 4.4 und 4.5). Das bedeutet, dass durch die Mutation der D-Boxen die NLS in der N-terminalen Domäne beeinträchtigt wurde. Mit Hilfe eines NLS-Mappers können drei potentielle NLS im N-terminalen Bereich von Cdc5 vorausgesagt werden. Dabei wird für die monopartite NLS 55-PAQKKKREKL-64 (Abb. 5.1 A), die die D-Box 2 beinhaltet, eine exklusive Kernlokalisation und für die beiden bipartiten NLS (Abb. 5.1 B) eine eher partielle Kernlokalisation vorhergesagt.

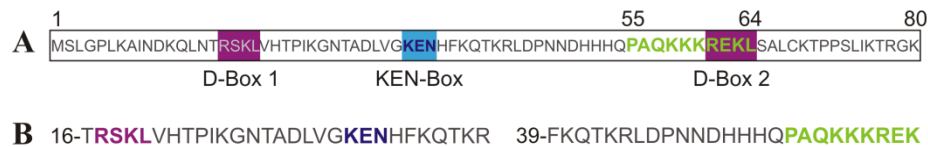


Abbildung 5.1 Potentielle NLS in der N-terminalen Domäne von Cdc5

Die drei potentiellen NLS-Sequenzen wurden mit Hilfe des NLS-Mappers (nls-mapper.iab.keio.ac.jp/) ermittelt. Für die monopartite NLS (A) wurde eine exklusive Kernlokalisierung vorhergesagt, da sie einen Score von 8 (auf einer Skala von 1 bis 10) erzielte. Die beiden bipartiten NLS-Sequenzen (B) wurden mit 6,6 und 7 bewertet. Für diese Werte wird eine partielle Kernlokalisierung prognostiziert.

Durch die Fusion einer zusätzlichen NLS an die D-Box Mutante Cdc5N80db1/2-GFP konnte geklärt werden, dass die RXXL-Sequenzen nicht als D-Boxen bzw. Degron, sondern als Teil der NLS im N-terminalen Bereich zur Instabilität von Cdc5 beitragen. Cdc5N80db1/2-GFP-NLS lokalisierte wie Cdc5N80-GFP hauptsächlich im Zellkern und war in der G1-Phase deutlich instabiler als Cdc5N80db1/2-GFP (siehe Abb. 4.6 und 4.7). Zusammengefasst sprechen die Daten dafür, dass die N-terminale Domäne von Cdc5 zum einen durch die KEN-Box und zum anderen durch die NLS zur Instabilität von Cdc5 beiträgt.

Dennoch lässt sich nicht vollkommen ausschließen, dass es sich bei den RXXL-Sequenzen um ein schwaches Degron handeln könnte, da Cdc5N80db1/2-GFP durch die Fusion der zusätzlichen NLS gegenüber Cdc5N80-GFP-NLS immer noch leicht stabilisiert war (siehe Abb. 4.7). Möglicherweise kooperieren die KEN- und die RXXL-Sequenzen miteinander. Neueste Studien zur Substrat-Bindung durch die APC-Co-Aktivatoren in *S. pombe* und humanen Zellen konnten in der WD40-Domäne sowohl eine KEN-Box- als auch eine D-Box-Bindestelle identifizieren (Chao *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012). Allerdings sind die Beobachtungen hinsichtlich der Kooperation der beiden Degrons kontrovers. Chao *et al.* (2012) zeigen, dass eine KEN-Box gefolgt von einer D-Box effizienter gebunden wurde als die Degrons alleine. Wohingegen Tian *et al.* (2012) zeigen, dass die D-Box die Ubiquitinierung von KEN-Box-Substraten reduzierte. Die Daten von Cdc5N80 sprechen eher für die Theorie von Chao *et al.* (2012), da die Mutation von RXXL nicht zu einer verstärkten Instabilität führte. Die verstärkte Instabilität wäre zu erwarten, wenn die D-Boxen die KEN-Box in ihrer Funktion einschränkt. Es wäre auch möglich, dass es sich bei einer der beiden RXXL-Sequenzen um eine D-Box handelt und dass die andere, vermutlich die zweite, zur NLS gehört. Um dies zu überprüfen und die NLS in N80 genauer zu lokalisieren, wäre es sinnvoll die RXXL-Sequenzen im Fusionsprotein Cdc5N80-GFP getrennt voneinander zu mutieren. Eine anschließende Analyse der Instabilität und der Lokalisation der neuen Fusionsproteine würde die Rolle der RXXL-Sequenzen in Cdc5N80 aufklären.

Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass auch im Bezug auf das volle Länge-Protein von Cdc5 die Instabilität überwiegend durch die KEN-Box vermittelt wird (Arnold, 2008). Da die Deletion der N-terminalen Domäne Cdc5 in der G1-Phase vollständig stabilisiert, die Mutation der KEN-Box aber nur größtenteils, lässt sich vermuten, dass die NLS in der N-terminalen Domäne auch in Bezug auf das volle Länge-Protein einen Beitrag zur Instabilität leistet. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass sich innerhalb dieses Bereichs noch weitere unbekannte Signale befinden, die zur Instabilität beitragen.

Die Instabilität der humanen Plk1 wird ebenfalls durch APC^{Cdh1} vermittelt, allerdings sind die Position und das Abbausignal in *S. cerevisiae* nicht konserviert. Plk1 wird D-Box-vermittelt vom APC^{Cdh1} erkannt, die sich zwischen der Kinase-Domäne und der PBD befindet (siehe Abb. 3.4; Lindon und Pines, 2004).

5.1.2 Kernlokalisation vermittelt Instabilität in G1

Die Ergebnisse der Cdc5N80-Stabilitätsstudien liefern zusätzlich einen neuen Aspekt der generellen Regulation der APC^{Hct1}-vermittelten Degradation. Aufgrund der stabilisierenden Wirkung der partiellen zytoplasmatischen Lokalisation von Cdc5N80db1/2-GFP stellte sich die Frage, ob eine Kernlokalisation zusätzlich zu den Degrons eine Voraussetzung für die Ubiquitinierung durch den APC^{Hct1} ist. Dadurch würde die Instabilität nicht nur zeitlich, sondern auch räumlich reguliert werden. Cdc20, ein weiteres Substrat des APC^{Hct1}, enthält im N-terminalen Bereich zwei D-Boxen, die die Instabilität vermitteln. Interessanterweise waren die 80 N-terminalen Aminosäuren von Cdc20 ebenfalls hinreichend für die Instabilität in G1 und die Lokalisation des Fusionsproteins Cdc20N80-GFP im Zellkern (Höckner, unveröffentlichte Daten). Um der Theorie nach zu gehen, dass die Lokalisation die Instabilität beeinflusst, wurde eine NES an Cdc5N80-GFP fusioniert. Die Mikroskopie-Daten und die Westernblot-Analyse zeigten, dass Cdc5N80-GFP-NES fast ausschließlich im Zytoplasma lokalisierte und tatsächlich in G1 stabilisiert war (siehe Abb. 4.6 und 4.7). Diese Ergebnisse konnten anhand von Cdc20N80-GFP-NES bestätigt werden (Höckner, unveröffentlichte Daten). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nicht nur die Lokalisation der Substrate im Zellkern eine Rolle bei der Erkennung durch den APC^{Hct1} spielt, sondern dass auch die Lokalisation innerhalb des Zellkerns die Degradationseffizienz beeinflusst. Grundsätzlich sind die Substrukturen wie der Nukleolus oder das Chromatin innerhalb des Zellkerns, im Gegensatz zum Zytoplasma, für den APC^{Hct1} zugänglich. Allerdings wurde vor allem durch die gezielte Lokalisation von Cdc5N80-GFP im Nukleolus die Degradation verzögert (siehe Abb. 4.8 und 4.9). Die Theorie, dass die APC^{Hct1}-abhängige

Degradation in der G1-Phase ausschließlich im Zellkern stattfindet, wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass Hct1 am Ende der Mitose nur im Zellkern lokalisiert und dadurch mit dem APC interagieren kann (Jaquenoud *et al.*, 2002). Hct1 wird durch Phosphorylierung bis zur späten Mitose im Zytoplasma gehalten und kann erst nach Aktivierung von Cdc14 zurück in den Kern transportiert werden. Lokalisationsstudien in Hefe zeigen, dass der APC während des Zellteilungszyklus hauptsächlich im Zellkern lokalisiert (siehe Abb. 4.29; Jaquenoud *et al.*, 2002; Melloy und Holloway, 2004). Zudem sind bereits APC^{Hct1}-Substrate bekannt, die ähnlich wie Cdc5 und Cdc20 in der Nähe ihrer Degrons eine NLS enthalten. Das Motorprotein Cin8 benötigt für die Degradation eine C-terminale Region, die sowohl eine funktionelle KEN-Box als auch eine NLS enthalten muss (Hildebrandt und Hoyt, 2001). Cik1, das mit dem Kinesin Kar3 assoziiert, liegt in zwei Isoformen vor, wobei die längere einen N-terminalen Bereich enthält, der sowohl für die APC^{Hct1}-abhängige Degradation als auch den Kernimport notwendig ist. Allerdings enthält dieser Bereich keine D- oder KEN-Box. Die kurze Isoform von Cik1 dagegen ist stabil (Benanti *et al.*, 2009). Ein weiteres Kinesin, Kip1, wird zwar APC^{Cdc20}-abhängig degradiert, aber benötigt ebenfalls eine NLS zur Degradation (Gordon und Roof, 2001). Die gezeigten Ergebnisse dieser Arbeit und die bereits bekannten Daten legen nahe, dass APC-vermittelte Degradation ausschließlich im Zellkern stattfindet und ein Substrat zusätzlich zu einem Degron eine NLS benötigt.

Die Proteine Hs11 und Iqg1, die am Knospenhals lokalisieren, werden ebenfalls APC^{Hct1}-abhängig in der G1-Phase abgebaut (Burton und Solomon, 2000; Burton und Solomon, 2001; Ko *et al.*, 2007). Daher stellt sich die Frage, wie diese Proteine in den Kern gelangen, um dort degradiert zu werden. Eine Möglichkeit wäre, dass beide Proteine eine bis jetzt noch nicht identifizierte NLS enthalten. Da eine Akkumulation im Zellkern nicht sichtbar ist, wäre es denkbar, dass sie, sobald sie in den Kern transportiert werden, auch abgebaut werden. Für diese Möglichkeit würde auch die Beobachtung sprechen, dass Cdc5N80-GFP-NES nicht sichtbar im Kern lokalisierte, aber dennoch mit der Zeit abgebaut wurde (siehe Abb. 4.6 und 4.7). Da das Fusionsprotein innerhalb von Cdc5N80 eine NLS enthält, wäre es denkbar, dass der kurzfristige Import ausreicht, dass der geringe nukleäre Anteil degradiert wird. Eine andere oder auch zusätzliche Möglichkeit wäre eine bereits bestehende Überlegung, dass Hct1 seine Substrate bereits im Zytoplasma bindet und mit in den Kern transportiert (Jaquenoud *et al.*, 2002; Ko *et al.*, 2007), da Hct1 in der Lage ist ohne den APC mit seinen Substraten zu interagieren (Burton und Solomon, 2001; Pfleger *et al.*, 2001; Schwab *et al.*, 2001; Burton *et al.*, 2005).

Die Notwendigkeit eines Degrons und der Kernlokalisation für eine effiziente Proteolyse in der G1-Phase fügt der zeitlichen eine räumliche Regulation der APC-vermittelten Degradation von Proteinen hinzu. Dieser Mechanismus wäre auch für höhere Eukaryoten von Bedeutung, da diese Zellen in G1 eine Kernmembran aufweisen.

5.1.3 N80 stimuliert Kinase-Aktivität von Cdc5 *in vivo*

Neben der zellzyklusabhängigen Transkription und der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse wird die Aktivität von Cdc5 durch Cdk1-abhängige Phosphorylierung reguliert. Cdc5 und Cdk1 kooperieren miteinander, um ihre Aktivität gegenseitig zu fördern. Zum einen phosphoryliert Cdk1 den Threoninrest T242 innerhalb der Kinase-Domäne von Cdc5 (Mortensen *et al.*, 2005), zum anderen fungiert Cdk1 als *priming* Kinase, wodurch die Bindung der Cdc5-Substrate durch die PBD gefördert wird (Elia *et al.*, 2003b; Archambault und Glover, 2009). Zusammen aktivieren sie die Transkription des *CLB2*-Genclusters, dem *CLB2* und *CDC5* angehören, wodurch sie ihre eigene Expression stimulieren (Darieva *et al.*, 2006). Cdc5 wiederum ist an der Destabilisierung von Swe1, dem mitotischen Cdk1-Inhibitor, beteiligt. Die Inhibierung der Cdk1 durch Swe1 findet vor allem als Antwort auf den Morphogenese-Kontrollpunkt statt, wodurch die G2-Phase verzögert wird (Lew, 2003). Somit trägt Cdc5 zur Beendigung des Kontrollsystems und damit zur Aktivierung von Cdk1 bei. Zusätzlich zu T242 befinden sich in Cdc5 drei weitere Cdk1-Konsensussequenzen, die *in vivo* phosphoryliert sind (Mortensen *et al.*, 2005). Zwei davon, T23 und T70, befinden sich in der N-terminalen Domäne von Cdc5 und tragen ebenfalls zur Funktionalität von Cdc5 bei. Dies konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, da *cdc5pm1/2* im Gegensatz zu *cdc5pm1/2D* die Deletion von *CDC5* nicht vollständig komplementieren konnte (siehe Abb. 4.10 und 4.11).

Um die Funktion dieser beiden N-terminalen Cdk1-abhängigen Phosphorylierungen zu analysieren, wurde zunächst der Einfluss auf die Instabilität und die Lokalisation überprüft, da dies bekannte Funktionen der N-terminalen Domäne sind (siehe 5.1.1). Außerdem befinden sich die beiden Cdk1-Phosphorylierungsstellen T23 und T70 in der Nähe der RXXL-Sequenzen, die zur Kernlokalisation und möglicherweise zur Instabilität beitragen. Eine kürzlich erschienene Arbeit vermutet einen Zusammenhang der Stabilität mit der Phosphorylierung von T23 (Simpson-Lavy und Brandeis, 2011). Allerdings kann die Cdk1-abhängige Phosphorylierung von T23 für die Instabilität in der G1-Phase keine wichtige Rolle spielen, da in dieser Phase die Cdk1-Aktivität sehr gering ist (Enserink und Kolodner, 2010). Möglicherweise schützt aber die Phosphorylierung Cdc5 vor dem Abbau während der Mitose, wenn die Cdk1-Aktivität hoch ist. Eine derartige Regulation der Degradation auf

Substratebene konnte bereits für Pds1 gezeigt werden, wo ebenfalls die D-Box durch eine Cdk1-Phosphorylierungsstelle flankiert ist und durch Phosphorylierung dieser stabilisiert wird (Holt *et al.*, 2008). Die Lokalisation von Cdc5 im Zellkern wird zusätzlich zu der NLS im N-terminalen Bereich durch eine NLS innerhalb der Kinase-Domäne vermittelt, die auch in Plk1 konserviert ist (Taniguchi *et al.*, 2002; Nakashima *et al.*, 2008). Da die Funktion der NLS auch häufig über Phosphorylierung reguliert wird, wäre es denkbar, dass die benachbarten Phosphorylierungen die NLS innerhalb der N-terminalen Domäne kontrollieren. Cdc14 und Swi5 werden durch Phosphorylierung ihrer NLS im Zytoplasma gehalten (Moll *et al.*, 1991; Mohl *et al.*, 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Konsensussequenzen für die Cdk1-Phosphorylierung im N-terminalen Bereich weder einen Einfluss auf die Instabilität noch auf die Lokalisation von Cdc5 haben (siehe 4.12 und 4.13). Während der M-Phase war Cdc5N80pm1/2-GFP ebenso stabil wie Cdc5N80-GFP. Es konnte auch kein Unterschied in der Instabilität der volle Länge-Proteine Cdc5, Cdc5pm1/2 und Cdc5pm1/2D festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Genauso war auch kein Unterschied in der Lokalisation von Cdc5-GFP, Cdc5pm1/2-GFP und Cdc5pm1/2D-GFP nachzuweisen. Allerdings wäre es denkbar, dass die NLS im N-terminalen Bereich von Cdc5 in Bezug auf das volle Länge-Protein nicht entscheidend für die Lokalisation im Zellkern ist und deshalb kein Unterschied nachweisbar war. Nakashima *et al.* (2008) konnten durch Mutation von 58-KKKR-61 in Cdc5 keine veränderte Kernlokalisation von Cdc5 feststellen. Allerdings hatte die Mutation der beiden Cdk1-Phosphorylierungsstellen in den Fusionsproteinen Cdc5N80pm1/2-GFP und Cdc5N80pm1/2D-GFP ebenfalls keinen Einfluss auf die Kernlokalisation (Daten nicht gezeigt), obwohl die NLS für N80 hinreichend ist (siehe 5.1.1). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die N-terminale Domäne von Cdc5 zusätzlich zur Vermittlung der Instabilität sowie der Kernlokalisation eine weitere Funktion, die durch Cdk1 reguliert wird, hat.

Mit Hilfe von genetischen Interaktionsstudien und *live-cell imaging* der *cdc5pm1/2*-Mutante konnte eine Beeinträchtigung der biologischen Funktion von Cdc5 nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.14 – 4.17). Dies zeigte sich besonders in der verminderten Cdc14-Freisetzung und der damit zusammenhängenden verzögerten Spindel-Elongation. Da erhöhte Mengen von Cdc14 sowie von Cdc5pm1/2 den Phänotyp der *cdc5pm1/2*-Mutante supprimieren konnten (siehe Abb. 4.16 und 4.20), kam die Frage auf, ob die Cdk1-abhängigen Phosphorylierungen innerhalb der N-terminalen Domäne die Kinase-Aktivität von Cdc5 *in vivo* stimulieren. Diese Arbeit zeigt, dass die Überexpression von Cdc5pm1/2 im Gegensatz zu Cdc5 sowie Cdc5pm1/2D die Phosphorylierung von Cdc14 etwas geringer induzieren konnte

(siehe Abb. 4.18). Zudem konnte in einem Synchronexperiment der *cdc5pm1/2*-Mutante gezeigt werden, dass sowohl die beiden Cdc5-Substrate Scc1 und Bfa1 schlechter phosphoryliert wurden als auch die Degradation von Clb2 sowie Cdc5pm1/2 und somit der Austritt aus der Mitose verzögert war (siehe Abb. 4.19). Diese Ergebnisse und eine aktuelle Studie von Rock und Amon (2011) unterstreichen die starke Abhängigkeit der Cdc14-Freisetzung sowie des Austritts aus der Mitose von Cdc5. Zudem bestärken bekannte Ergebnisse die Vermutung, dass die N-terminale Region von Cdc5 die Kinase-Aktivität *in vivo* stimuliert. Zum einen wurde gezeigt, dass nur die Funktion der Kinase-Aktivität und nicht die der PBD für die Cdc14-Freisetzung sowie den Austritt aus der Mitose notwendig ist (Ratsima *et al.*, 2011), zum anderen wurde beobachtet, dass die Überexpression von Cdc5pm1/2 die Degradation von Clb2 im Gegensatz zu Cdc5 nicht induzieren kann (Neutzner, 2003). Außerdem ist bekannt, dass Cdc5 *in vitro* eine starke Autophosphorylierung aufweist, die von der Kinase-Aktivität abhängt, die bei Cdc5pm1/2 nicht stattfindet (Neutzner, 2003). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse und die bereits bekannten Daten sprechen dafür, dass die beiden N-terminalen Phosphorylierungen die Kinase-Aktivität von Cdc5 *in vivo* stimulieren.

Möglicherweise wird durch die N-terminalen Phosphorylierungen eine intramolekulare Interaktion von Cdc5 verhindert. Für die humane Plk1 ist gezeigt, dass die Kinase-Domäne und die PBD sich gegenseitig inhibieren und dass die Bindung eines optimalen Phosphopeptids die Kinase-Aktivität stimuliert. Zudem wird die Kinase-Aktivität durch die Phosphorylierung des Threoninrests T210 innerhalb der Kinase-Domäne stimuliert, wodurch gleichzeitig die Bindung der PBD verhindert wird (Elia *et al.*, 2003b; Lowery *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010). Zwar ist eine solche intramolekulare Interaktion für Cdc5 in *S. cerevisiae* nicht bekannt, aber aufgrund der starken Konservierung der Kinase-Domäne sowie der PBD durchaus vorstellbar (siehe Abb. 3.4). Der N-terminale Bereich von Cdc5 und Plk1 unterscheidet sich dagegen aufgrund der Aminosäure-Sequenz sowie seiner Bedeutung für die Instabilität deutlich (siehe Abb. 3.4 und 5.1.1). Der N-terminalen Region der Plk1 wird keine funktionelle Bedeutung zugeschrieben. Möglicherweise unterstützt Cdk1 die Kinase-Aktivität von Cdc5 zusätzlich zur Phosphorylierung der Kinase-Domäne durch die N-terminalen Phosphorylierungen, wodurch die Bindung der PBD verhindert wird. Bislang allerdings wurde eher eine negative Wirkung von Phosphorylierungen der N-terminalen Region auf die Kinase-Domäne von Ser/Thr-Kinasen gezeigt. Beispielsweise wird Ipl1 durch Cdk1-abhängige Phosphorylierung der beiden Serinreste S50 und S76 inhibiert (Zimniak *et al.*, 2012). Die Aktivität von Cdk1 wird ähnlich durch Swe1-abhängige Phosphorylierung des

Tyrosinrests Y19 im N-terminalen Bereich der Kinase-Domäne inhibiert (Booher *et al.*, 1993). Erst durch die Dephosphorylierung mittels Phosphatasen wird deren Aktivität erhöht, wodurch die Kinase-Aktivität von Cdk1 und Ipl1 zeitlich reguliert wird.

Um die positive regulatorische Wirkung der N-terminalen Phosphorylierungen auf die Kinase-Aktivität von Cdc5 genauer zu bestimmen, wären weitere Kinase-Aktivitäts-Assays *in vitro* sowie *in vivo* nützlich. Außerdem wäre eine Struktur-Analyse von Cdc5 hilfreich, um die intramolekulare Wechselwirkung des N-terminalen Bereichs mit der Kinase-Domäne nachzuweisen.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen schlussfolgern, dass die N-terminale Domäne von Cdc5 wichtig für die biologische Funktion ist und insbesondere die Funktion der Cdc14-Freisetzung durch die Cdk1-abhängige Phosphorylierung des N-terminalen Bereichs reguliert wird.

5.1.4 N-terminale Domäne ist in Hefen konserviert

Die N-terminale Domäne der Polo-Kinasen unterscheidet sich einerseits durch ihre Länge und andererseits durch ihre Funktion. Der N-terminale Bereich von Polo aus *D. melanogaster* ist relativ kurz, wohingegen der N-terminale Bereich der humanen Plk1 länger ist (siehe Abb. 3.4). Beide enthalten allerdings im Gegensatz zu Cdc5 weder KEN-Box oder RXXL-Sequenz noch Cdk1-Konsensussequenzen. Gleiches gilt auch für die N-terminalen Bereiche der Polo-Kinasen Plx1 aus *Xenopus laevis* und Plc1 aus *Caenorhabditis elegans* (Daten nicht gezeigt). Dagegen sind in Hefen die KEN-Box und/oder die RXXL-Sequenz, die potentielle NLS sowie beide Cdk1-Konsensussequenzen in der N-terminalen Domäne von Cdc5 verwandten Polo-Kinasen konserviert, wobei der relative Abstand der Motive zueinander unterschiedlich ist (Abb. 5.2). Der Vergleich der N-terminalen Regionen der verwandten Polo-Kinasen in Hefen zeigt, dass vor allem die Cdk1-Konsensussequenzen und die potentielle NLS stark konserviert sind. Die zu Cdc5 näher verwandten Polo-Kinasen enthalten überwiegend noch eine KEN- oder RXXL-Sequenz und die potentielle NLS (Abb. 5.2). Aufgrund dessen lässt sich annehmen, dass ein Degron im N-terminalen Bereich für die Instabilität ausreicht und es spricht dafür, dass die KEN-Box in Cdc5 das alleinige Degron ist. Die Polo-Kinase Plo1 aus *S. pombe* enthält in der recht kurzen N-terminalen Region zwar keine Degrons, aber beide Cdk1-Konsensussequenzen (Abb. 5.2). Zudem ist bereits bekannt, dass deren Proteinlevel während des Zellteilungszyklus nicht fluktuiert (Lee *et al.*, 2005b). Möglicherweise ist die Cdk1-abhängige Phosphorylierung der N-terminalen Domäne auch wichtig für die biologische Funktion von Plo1. Bei *Kluyveromyces lactis* sind ebenfalls beide Cdk1-

DISKUSSION

Konsensussequenzen konserviert, aber kein Degron in der N-terminalen Domäne vorhanden (Abb. 5.2). Dies lässt vermuten, dass die beiden Funktionen der N-terminalen Region, die Instabilität zu vermitteln und die Kinase-Aktivität *in vivo* zu stimulieren, unabhängig voneinander sind. Insgesamt bekräftigt der Sequenzvergleich der N-terminalen Domäne von Cdc5 verwandten Polo-Kinasen in Hefe, dass der N-terminale Bereich von Cdc5 einerseits für die Instabilität notwendig und andererseits für die biologische Funktion wichtig ist.

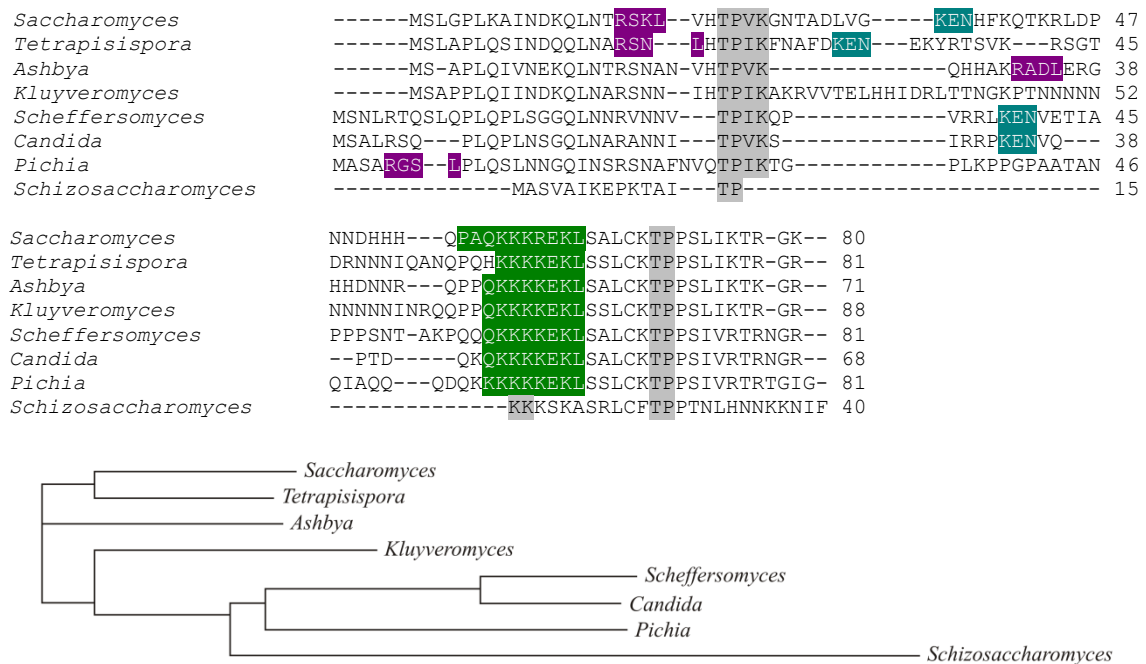


Abbildung 5.2 Sequenzvergleich der N-terminalen Domäne von Cdc5 mit verwandten Polo-Kinasen aus Hefen

Vergleich der N-terminalen Domäne von Cdc5 aus *S. cerevisiae* (*Saccharomyces*), Plo1 aus *S. pombe* (*Schizosaccharomyces*) und den verwandten Polo-Kinasen aus *Tetrapisispora phaffii*, *Ashbya gossypii*, *Kluyveromyces lactis*, *Scheffersomyces stipitis*, *Candida albicans* sowie *Pichia pastoris*. Die D-Boxen bzw. RXXL-Sequenzen sind pink, die KEN-Box türkis, die potentielle NLS grün und die Cdk1-Konsensussequenzen grau dargestellt. Die Proteinsequenzen stammen aus der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe des Programms ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) sowie der Phylogeniestammbaum mit Hilfe des Programms ClustalW2 Phylogeny (http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny/index.html) erstellt.

5.2 Cdc5 – ein negativer Regulator des Spindelkontrollsystems

5.2.1 MCC-Bildung am unbesetzten Kinetochor

Das Spindelkontrollsystem wird nach fehlerhafter Anheftung der Mikrotubuli an die Kinetochore der Chromosomen aktiviert, um die Trennung der Schwesterchromatiden zu

verhindern (Musacchio und Salmon, 2007; Kim und Yu, 2011). Dazu wird der APC^{Cdc20} inhibiert und die Zellen arretieren in der Metaphase. Durch die Aktivierung des Spindelkontrollsystems werden verschiedene Komponenten an die unbesetzten Kinetochore rekrutiert, die sich in *S. cerevisiae* etwas entfernt vom Kinetochor-Cluster befinden. Lokalisationsstudien zeigen, dass dort Mad1, Mad2, Bub1 und auch Bub3 zu detektieren sind (Iouk *et al.*, 2002; Kerscher *et al.*, 2003; Gillett *et al.*, 2004). Der Effektor des SAC ist der MCC, der neben Mad2 und Bub3 auch aus Mad3 und Cdc20 besteht (Musacchio und Salmon, 2007). In dieser Arbeit konnte erstmals Mad3 ebenso wie Cdc20 an den unbesetzten Kinetochoren mittels *live-cell imaging* nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.28 und 4.29). Somit werden alle Komponenten des MCC ans unbesetzte Kinetochor in *S. cerevisiae* rekrutiert, wodurch die räumliche Nähe vermutlich die Bildung des MCC fördert. Dabei scheint die MCC-Bildung vor allem von Mad1 abhängig zu sein (siehe Abb. 4.31; Iouk *et al.*, 2002; Gillett *et al.*, 2004). Interessanterweise ist auch die Mad1-Kinetochor-Lokalisation von den MCC-Komponenten Mad2, Bub3 und Cdc20 abhängig (siehe Abb. 4.31; Gillett *et al.*, 2004). Möglicherweise verstärken die MCC-Komponenten und Mad1 gegenseitig ihre Lokalisation am unbesetzten Kinetochor, wodurch eine schnelle Reaktion auf die Aktivierung des SAC erfolgen kann. Auch in humanen Zellen konnte die Lokalisation der MCC-Komponenten am unbesetzten Kinetochor gezeigt werden (Howell *et al.*, 2004). Die Bindung des MCC an den APC findet dagegen nicht an den unbesetzten Kinetochoren statt. Melloy und Holloway (2004) zeigen, dass nach Nocodazol-Behandlung der Zellen kein nukleäres, punktförmiges Signal der APC-Untereinheit Cdc23 zu detektieren ist, sondern ein gleichmäßiges Kernsignal. Die Lokalisation von Cdc23 in Nocodazol-arretierten Zellen im Zellkern konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Abb. 4.29). Diese Daten sprechen dafür, dass die Inhibierung des APC durch die Bindung des MCC im Nukleoplasma stattfindet. Zusätzlich könnte der APC durch die räumliche Trennung von Cdc20, das ans unbesetzte Kinetochor rekrutiert wird, inhibiert werden. Denn würde Cdc20 und der APC gleichzeitig am Kinetochor lokalisieren, könnte sich aktiver APC^{Cdc20} bilden und der MCC müsste zur Inhibierung Cdc20 vom APC verdrängen. Durch die räumliche Trennung wird dem APC Cdc20 entzogen und der APC bleibt inaktiv.

5.2.2 Inaktivierung des SAC durch Cdc5

Da infolge der Aktivierung des SAC der APC^{Cdc20} inhibiert wird, sind die Proteinlevel der APC^{Cdc20}-Substrate Pds1 und Clb2 stabilisiert (Musacchio und Salmon, 2007). Der Sic1-Level ist unter diesen Bedingungen niedrig, da Cdc14 im Nukleolus inaktiv gehalten wird. Während

der Mitose wird Cdc5 maximal exprimiert und die Kinase-Aktivität ist ebenfalls hoch (Lee *et al.*, 2005b), wodurch eine Funktion von Cdc5 im SAC durchaus vorstellbar wäre. Allerdings ist eine direkte Beteiligung von Cdc5 am SAC nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cdc5 dem SAC entgegenwirkt, da die Proteinlevel von Pds1, Clb2 sowie Cdc5 selbst nach der Überexpression von Cdc5 in Nocodazol-arretierten Zellen abnahmen und der Proteinlevel von Sic1 anstieg (siehe Abb. 4.21). Daher ist anzunehmen, dass durch erhöhte Mengen von Cdc5 der APC^{Cdc20} und der APC^{Hct1} aktiviert wurden sowie Cdc14 freigesetzt wurde. Es ist bereits beschrieben, dass die Überexpression von Cdc5 eine verfrühte Cdc14-Freisetzung zur Folge hat (Visintin *et al.*, 2003). Da die APC^{Cdc20}-vermittelte Pds1-Degradation auch in der *cdc14-3* Mutante durch die Überexpression von Cdc5 induziert werden konnte, deuten diese Daten darauf hin, dass Cdc5 neben der Cdc14-Aktivierung über eine weitere Funktion zur Beendigung des SAC beiträgt. Bereits bekannte Daten sprechen dafür, dass Cdc5 und auch Cdc20 an der Inaktivierung des SAC beteiligt sind, da deren Gen-Deletion zu einem verlängerten Metaphase-Arrest führt (Rossio *et al.*, 2010). Ein weiteres Argument dafür, dass Cdc5 an der Beendigung des SAC beteiligt ist, liefern Daten, die zeigen, dass in genetischen Interaktionsstudien erhöhte Cdc5-Mengen sich wie *mad1-Δ*, *mad2-Δ*, *mad3-Δ* und *bub3-Δ* verhalten, da alle synthetisch letal mit *bim1-Δ*, *kar3-Δ* sowie *cik1-Δ* sind (Daniel *et al.*, 2006; Bittner, 2011). Darüber hinaus deutet vieles darauf hin, dass die humane Polo-Kinase Plk1 an der Inaktivierung des Spindelkontrollsystems beteiligt ist. Plk1 lokalisiert an unbesetzten Kinetochoren in der Prometaphase und ist für die Anheftung der Mikrotubuli an die Kinetochore wichtig (Petronczki *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012a; Liu *et al.*, 2012b). Eine Lokalisation von Cdc5 an den unbesetzten Kinetochoren in *S. cerevisiae* konnte allerdings bei endogenen Mengen nicht detektiert werden (siehe Abb. 4.37). Außerdem wirken endogene Mengen von Cdc5 dem SAC nicht entgegen (siehe Abb. 4.21 und 4.37). Möglicherweise ist Cdc5 zur Auflösung des SAC nach längerem Arrest nötig. Aufgrund einer anhaltenden Transkription könnte Cdc5 zu einem hohen Level akkumulieren, der dann ausreichend für die SAC-Inaktivierung und bzw. oder die Lokalisation an den unbesetzten Kinetochoren wäre. Um dieser Theorie nachzugehen, ist die Analyse der Cdc5-Lokalisation nach Überexpression wichtig. Da Cdc5 zur Adaptation des DNA-Schadenkontrollsystems und zur Beendigung des Morphogenese-Kontrollsystems notwendig ist (Toczyski *et al.*, 1997; Sakchaisri *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005a), wäre es denkbar, dass Cdc5 auch bei anderen Kontrollsystemen wie dem SAC zur Adaptation nötig ist.

5.2.3 Wirkungsweise von Cdc5 im SAC

Da die Überexpression von Cdc5 die Inaktivierung des SAC zur Folge hat, stellt sich die Frage, wie Cdc5 den SAC inaktiviert. Nach der Inaktivierung des SAC durch die bipolare Anheftung der Mikrotubuli an die Kinetochore, werden die SAC-Komponenten von den Kinetochoren wieder entfernt (Musacchio und Salmon, 2007; Kim und Yu, 2011). Der Mechanismus der Inaktivierung des SAC ist aber noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise trägt Cdc5 dazu bei, indem es die Lokalisation von Mad1 und dadurch die Bildung des MCC an den unbesetzten Kinetochoren verhindert. Diese Vermutung bestärken einerseits die Ergebnisse der Lokalisationsstudien zur Abhängigkeit der SAC-Komponenten voneinander, die zeigen, dass Mad2 gänzlich und Bub3 sowie Mad3 teilweise von Mad1-abhängig am unbesetzten Kinetochor lokalisierten (siehe Abb. 4.31; Iouk *et al.*, 2002; Gillett *et al.*, 2004). Andererseits konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass erhöhte Mengen von Cdc5 die Lokalisation von Mad1, Mad2 und Bub3 am unbesetzten Kinetochor verringerte. Die Auswirkungen auf die Lokalisation von Mad1 und Mad2 waren am stärksten. Beide lokalisierten nach Überexpression von Cdc5 in Nocodazol-arretierten Zellen kaum am unbesetzten Kinetochor (siehe Abb. 4.26 und 4.27). Allerdings hatte die Überexpression von Cdc5 keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen Mad1 und Mad2 (siehe Abb. 4.23), jedoch auf die Interaktion von Cdc20 mit Mad2 (siehe Abb. 4.22) sowie mit Mad3 und Bub3 (Bittner, 2011). Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cdc5 die Lokalisation von Mad1 am unbesetzten Kinetochor verhindert. Dies wirft die Frage auf, ob Cdc5 die Dissoziation von Mad1 vom unbesetzten Kinetochor induziert oder die Rekrutierung von Mad1 ans unbesetzte Kinetochor verhindert. Die gezeigten Daten sprechen eher dafür, dass die Dissoziation von Mad1 induziert wurde, da Mad1 zunächst am unbesetzten Kinetochor lokalisierte und durch die anschließende Überexpression von Cdc5 weniger Zellen mit Mad1-Kinetochor-Lokalisation detektierbar waren (siehe Abb. 4.26 B). Anders als hier in *S. cerevisiae* gezeigt, scheint die Plk1 in humanen Zellen nicht nur an der Inaktivierung, sondern auch an der Aktivierung des SAC beteiligt zu sein. Plk1 ist für die Lokalisation von Mad1 am unbesetzten Kinetochor notwendig (Chi *et al.*, 2008).

Da in Gegenwart von erhöhten Cdc5-Mengen die Mad1-Lokalisation am unbesetzten Kinetochor verringert ist, stellt sich die Frage, wie Cdc5 die Lokalisation von Mad1 beeinflusst. Eine physische Interaktion von Cdc5 mit Mad1 in Nocodazol-arretierten Zellen konnte mittels Co-Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt) und ist auch nicht bekannt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Cdc5 die Aufrechterhaltung der Lokalisation von Mad1 an den unbesetzten Kinetochoren verhindert, indem Cdc5 direkt auf

das Kinetochor wirkt. Ndc80 gehört zum Ndc80-Komplex des äußeren Kinetochors, der zur Mikrotubuli-Anheftung nötig ist (Santaguida und Musacchio, 2009; Cho *et al.*, 2010). Für Ndc80 ist eine physische Interaktion mit Cdc5 beschrieben (Snead *et al.*, 2007). Allerdings ergab sich in dieser Arbeit kein Hinweis auf eine Cdc5-abhängige Phosphorylierung von Ndc80 (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren ist eine physische Interaktion von Cdc5 mit Mps1 beschrieben (Snead *et al.*, 2007). Mps1 lokalisiert vermutlich Ndc80-abhängig am Kinetochor (Kemmler *et al.*, 2009) und ist für die Rekrutierung von Mad1 und Mad2 ans unbesetzte Kinetochor notwendig (Kim und Yu, 2011). Durch Überexpression ist Mps1 in der Lage den SAC zu aktivieren und die Zellen arretieren in der Metaphase (Hardwick *et al.*, 1996). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Überexpression von Mps1 und Cdc5 den Arrest in der Metaphase verzögert und die Zellen besser wachsen können (siehe Abb. 4.35). Daraus folgt, dass Cdc5 direkt auf oder unterhalb von Mps1 wirkt, denn würde Cdc5 oberhalb von Mps1 wirken, würde die gleichzeitige Überexpression von Cdc5 und Mps1 den Metaphase-Arrest nicht beeinflussen. Darüber hinaus konnte eine durch die Überexpression von Cdc5 induzierte mögliche Phosphorylierung von Mps1 nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.36). Diese Daten legen nahe, dass Mps1 ein direktes Substrat von Cdc5 ist und Cdc5 Mps1 entgegenwirkt. Es wäre möglich, dass die Cdc5-abhängige Phosphorylierung die Aktivität von Mps1 inhibiert und bzw. oder dass dadurch die Lokalisation (möglicherweise die Wechselwirkung mit Ndc80) am Kinetochor beeinflusst wird. Dies könnte dann die Mad1-Dissoziation vom unbesetzten Kinetochor zur Folge haben. Daher wäre eine Lokalisationsanalyse von Mps1 bei erhöhten Mengen von Cdc5 hilfreich, um die Wirkung von Cdc5 auf Mps1 weiter zu klären.

Eine weitere Komponente des Kinetochors mit der eine physische Interaktion von Cdc5 beschrieben ist, ist Slk19 (Park *et al.*, 2008). Die Lokalisation von Slk19 am Kinetochor ist ebenfalls von Ndc80 abhängig (Pagliuca *et al.*, 2009). Slk19 lokalisierte nach Aktivierung des SAC überwiegend am unbesetzten Kinetochor (siehe 4.4.6.2). Die Überexpression von Cdc5 hatte zur Folge, dass die Anzahl der Zellen mit zwei Slk19-Signalen anstieg (siehe Abb. 4.33). Ähnlich war auch die Auswirkung auf die Lokalisation von Ndc80. Es zeigte sich nach erhöhten Mengen von Cdc5 eine reduzierte Anzahl der Zellen mit unbesetztem Kinetochor und eine leicht erhöhte Anzahl der Zellen mit zwei Kinetochor-Cluster (siehe Abb. 4.32). Es ist bekannt, dass Cdc5 für die Mikrotubuli-Nukleation und die Mikrotubuli-Dynamik wichtig ist und dafür die Phosphorylierung von Slk19 sowie Stu2 eine Rolle spielt (Park *et al.*, 2008). Für Slk19 ist ebenfalls bekannt, dass es die Mikrotubuli

stabilisiert (Havens *et al.*, 2010). Kitamura *et al.* (2010) zeigen, dass Kinetochore selbst Mikrotubuli mit distalem Plus-Ende bilden und dass dafür Stu2 notwendig ist. Daher lässt sich mutmaßen, dass erhöhte Mengen von Cdc5 dazu führen, dass trotz Nocodazol die Mikrotubuli-Bildung stabilisiert ist und die unbesetzten Kinetochore zum Cluster zurück finden sowie die SAC-Komponenten vom Kinetochor entfernt werden. Um dies zu überprüfen wäre eine Analyse des Tubulin-Signals unter Nocodazol-Bedingungen und Cdc5-Überexpression nützlich. Zudem wäre es denkbar, dass Cdc5 neben der Inaktivierung des SAC auch eine positive Wirkung auf den weiteren Ablauf der Mitose hat, indem Cdc5 hilft die defekte Spindel wieder zu reparieren.

Möglicherweise ist Cdc5 an mehreren Ereignissen der Inaktivierung des SAC beteiligt. Eine indirekte Wirkung von Cdc5 durch Cdc14 wäre durchaus auch vorstellbar. Cdc14 ist wichtig für die Relokalisation des CPC zur *spindle midzone* während der Anaphase, um eine Reaktivierung des SAC zu verhindern (Mirchenko und Uhlmann, 2010). Dafür ist die Dephosphorylierung von Sli15 notwendig. Im Zuge einer Interaktionsstudie von Cdc14 wurde auch Mad1 als potentiell Substrat identifiziert (Bloom *et al.*, 2011). Mad1 wird nach Aktivierung des SAC hyperphosphoryliert (Hardwick *et al.*, 1996). Möglicherweise trägt die Dephosphorylierung durch Cdc14 zur Inaktivierung des SAC bei.

Die Aktivität von Cdk1 ist ebenso hoch wie die von Cdc5 während der Mitose. Liang *et al.* (2011) vermuten, dass Cdk1 zur Inaktivierung des SAC beiträgt. Zum einen stimuliert Cdk1 die *CDC20*-Transkription, um freies Cdc20 zum Eintritt in die Anaphase bereit zu stellen und zum anderen scheint Cdk1 an der Koordination der Spindeldynamik beteiligt zu sein (Liang *et al.*, 2011). Cdc5 stimuliert ebenfalls die Transkription des *CLB2*-Genclusters, dem *CDC20* angehört, und wird wie bereits erwähnt für die Spindelelongation sowie die Spindeldynamik benötigt (Darieva *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008). Deshalb wäre es durchaus möglich, dass Cdc5 zusammen mit Cdk1 die Inaktivierung des SAC induziert.

Zusammenfassend lässt sich resümieren, dass Cdc5 ein negativer Regulator des Spindelkontrollsystems ist. Die Ergebnisse legen nahe, dass Cdc5 die Lokalisation von Mad1 am unbesetzten Kinetochor verhindert. Mps1 wurde als potentiell Substrat identifiziert, wobei die genaue Wirkungsweise von Cdc5 noch weiter analysiert werden muss.

6 Methoden

6.1 Arbeiten mit Bakterien

Zur Amplifikation von *Escherichia coli*- und Hefeshuttlevektoren wurde der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α verwendet.

Stamm	relevanter Genotyp
DH5 α	F' ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)-U169 <i>deoR endA1 gyrA96 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA recA1 relA1 supE44 thi-1 λ</i>

6.1.1 Kultivierung von DH5 α -Zellen

Die Kultivierung der Bakterien wurde in LB-Flüssigmedium und auf LB-Agarplatten mit je 100 μ g/ml Ampicillin bei 37°C durchgeführt.

6.1.2 Transformation von DH5 α -Zellen

Die Transformation von DH5 α -Zellen wurde mit Hilfe der Elektroporation durchgeführt. Aufgrund von kurzfristigem Anlegen hoher Spannung wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht, wodurch Fremd-DNA aufgenommen werden kann (Dower *et al.*, 1988). Dafür werden elektrokompetente Zellen verwendet.

6.1.2.1 Herstellung elektrokompetenter DH5 α -Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden zweimal 750 ml TB-Medium mit jeweils 40 OD₆₀₀-DH5 α -Zellen aus einer Übernachtskultur angeimpft. Nach ca. 20 h Schütteln bei 25°C wurden die Zellen (OD₆₀₀ ca. 1) auf Eis abgekühlt und bei 4°C geerntet (3000 Upm, 15 min). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 150 ml kaltem sterilen Wasser gewaschen und in 30 ml kaltem 10%igen Glycerin aufgenommen. Nach erneutem Abzentrifugieren (4000 Upm, 10 min) wurden die Zellen schließlich in 10 ml 10%igem Glycerin resuspendiert, in 100 μ l Fraktionen auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert.

6.1.2.2 Transformation von elektrokompetenten Zellen mittels Elektroporation

Für die Transformation mit Fremd-DNA wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 1:2 mit sterilem Wasser verdünnt. Die Hälfte der verdünnten Bakterien-

suspension wurden mit 5 µl Ligationsansatz (20 min dialysiert) oder 1 µl Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte unter folgenden Parametern:

Feldstärke	12,5 kV/cm
Widerstand	200 Ω
Kapazität	25 µF
Kondensatorspannung	2,5 kV

Nach dem Stromimpuls wurden die Zellen sofort in 1 ml auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium gegeben und für die phänotypische Expression des β-Lactamase-Gens, das für die Ampicillinresistenz kodiert, ca. 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde auf LB-Ampicillin-Platten über Nacht bei 37°C auf positive Transformanten selektiert.

6.2 Arbeiten mit der Hefe *S. cerevisiae*

Es wurde mit Zellen des Stammhintergrundes W303 und S288C gearbeitet (siehe 7.1).

6.2.1 Kultivierung von Hefestämmen in Flüssigmedium

Zur Kultivierung von Hefezellen wurde XY-Vollmedium mit 2% Glukose (XYD) als Kohlenstoffquelle verwendet. Vorkulturen wurden in einem Volumen von 5 ml in Röhrchen auf einem Roller bei 30°C über Tag angezogen. Bei temperatursensitiven Stämmen erfolgte die Anzucht bei 25°C. Kulturen, die zur experimentellen Auswertung bestimmt waren, wurden aus den Vorkulturen überimpft und in Glaskolben im Schüttelwasserbad bei 25°C über Nacht kultiviert, so dass sich die Zellen am nächsten Tag in der exponentiellen Wachstumsphase (0,3 – 0,5 OD₆₀₀/ml) befanden.

Stämme, die Gene unter der Kontrolle des induzierbaren *GALI*-Promotors tragen, wurden in XY-Vollmedium mit 2% Raffinose (XYR) kultiviert. Die Induktion des Promotors erfolgte durch Zugabe von 2% Galaktose bei 25°C. Durch Umsetzen der Kultur in XYD-Medium wurde der *GALI*-Promotor wieder reprimiert.

6.2.2 Synchronisation von Hefekulturen

Hefezellen lassen sich unter bestimmten Bedingungen in verschiedenen Zellzyklusphasen arretieren und somit synchronisieren. Dadurch kann die zellzyklusspezifische Fluktuation von Proteinen untersucht werden.

6.2.2.1 Synchronisation durch das Paarungspheromon α -Faktor

Haploide Hefezellen mit unterschiedlichen Paarungstypen (*MATa* und *MAT α*) können sich durch Kernfusion zu einer diploiden Zelle paaren. Dafür müssen sich die Zellen in der G1-Phase befinden und sezernieren deshalb ein Paarungspheromon (α -Faktor bzw. α -Faktor), das einen Arrest der Zellen in der G1-Phase auslöst. Zellen, die keine Paarung vollzogen haben, können mit Hilfe von Proteasen die Pheromone abbauen und somit den Arrest wieder verlassen. Die Reaktion der Zellen auf die Anwesenheit von Paarungspheromonen wurde genutzt, um Zellen in der G1-Phase zu arretieren. Es wurden Zellen des Paarungstyps *MATa* verwendet, die zusätzlich eine Deletion des Gens *BAR1* trugen, welches für die α -Faktor-spezifische Protease Bar1 kodiert. Durch das Fehlen der Protease reagieren die Zellen sensibler auf das Pheromon und können den Arrest nicht mehr verlassen.

Für den Arrest in der G1-Phase wurde zu exponentiell wachsenden Zellen (0,3 – 0,5 OD₆₀₀/ml) 50 ng/ml α -Faktor (Stammlösung: 500 μ g/ml in H₂O) zugegeben und für 3 h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde der Arrestphänotyp der Zellen, der sog. Shmoo, im Mikroskop überprüft. Durch Umsetzen in pheromonfreies Medium wurden die arretierten Zellen synchron in den nächsten Zellzyklus entlassen.

6.2.2.2 Synchronisation durch das Spindelgift Nocodazol

Nocodazol ist ein Spindelgift, das eine Depolymerisation der Mikrotubuli zur Folge hat, wodurch das Spindelkontrollsystem aktiviert wird. Daher reagieren Zellen auf Nocodazol, indem sie in der frühen M-Phase arretieren.

Je nach Stammhintergrund wurde zu einer wachsenden Kultur (0,3 – 0,5 OD₆₀₀/ml) 7,5 μ g/ml (W303) oder 20 μ g/ml (S288C) Nocodazol (Stammlösung: 1,5 mg/ml in DMSO) zugegeben und unter Schütteln 3 h bei 25°C inkubiert. Der Arrest wurde anhand der Zellmorphologie im Mikroskop überprüft.

6.2.2.3 Synchronisation durch die Deletion von *CDC20*

Cdc20 ist notwendig für den Übergang von der Metaphase in die Anaphase (siehe 3.2.2.2). Fehlt Cdc20, so können die Schwesterchromatiden nicht getrennt werden und die Zellen arretieren in der Metaphase. Wird die Expression von *CDC20* durch einen reprimierbaren Promotor *pGALL* oder *pMET3* kontrolliert, können die Zellen durch Abschalten des Promotors in der Metaphase arretiert werden.

Zellen mit *CDC20* unter der Kontrolle des *GALL*-Promotors wurden in XY-Vollmedium mit 1% Raffinose und 2% Galaktose angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase in Medium mit Glukose (XYD) umgesetzt. Zellen mit *CDC20* unter der Kontrolle des *MET3*-Promotors wurden in Selektivmedium ohne Methionin (Induktion) angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase zur Repression des Promotors in Vollmedium mit zusätzlich 2 mM Methionin umgesetzt. Nach 3 h Inkubation bei 25°C wurde der Metaphase-Arrest der Zellen im Mikroskop überprüft.

6.2.3 Aufbewahrung von Hefestämmen

Hefestämme wurden einige Wochen in Form von Kolonien auf Agar-Platten bei 4°C aufbewahrt. Um Hefestämme dauerhaft zu konservieren, wurden 2 ml einer über Nacht im entsprechenden Medium gewachsenen Kultur geerntet, in 1 ml 15%igem Glycerin aufgenommen und bei -70°C eingefroren.

6.2.4 Kreuzung haploider Hefestämme

Zwei haploide Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps (*MATa* und *MATα*) können miteinander gekreuzt werden, wobei ein diploider Stamm entsteht. Tragen die Ausgangsstämme unterschiedliche Selektionsmarker (Auxotrophiemarker oder Resistenz gegen Antibiotika), können auf entsprechenden Selektionsplatten die diploiden Zellen selektiert werden. Dazu wurden jeweils Hefezellen aus einer Plattenkolonie mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in Wasser resuspendiert. Die Suspensionen wurden übereinander auf eine geeignete Platte pipettiert und über Nacht bei 25°C bzw. 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die diploiden Zellen auf Selektionsplatten ausgestrichen und die heranwachsenden Einzelkolonien zur Sporulation angesetzt. Falls die Selektion nicht möglich war, wurde die Sporulation direkt von der Kreuzungsplatte angesetzt.

6.2.5 Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse

Diploide Hefezellen können unter Kohlenstoff- und Stickstoffmangelbedingungen einen meiotischen Zellteilungszyklus durchlaufen. Dabei entstehen aus einer diploiden Zelle vier haploide Sporen, die von einer Hülle, dem Ascus, umschlossen sind und die so genannte Tetrade bilden. Um unter Laborbedingungen diesen, als Sporulation bezeichneten Vorgang zu induzieren, wurden diploide Zellen in 2 ml nährstoffreichem Prä-Sporulationsmedium angeimpft und über Nacht bei 25°C auf einem Roller angezogen. Am nächsten Tag wurden

die Zellen in 2 ml nährstoffarmem Sporulationsmedium gewaschen (2000 Upm, 2 min) und schließlich in 2 ml Sporulationsmedium auf einem Roller bei 25°C inkubiert. Die Sporulation dauerte je nach Stammhintergrund etwa 3 (W303) bis 6 Tage (S288C). Danach wurden 50 µl Sporensuspension mit 50 µl Novozym-Lösung gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um den Ascus zu verdauen. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden die Sporen auf geeigneten Platten vereinzelt und positioniert. Nach 2 bis 4 Tagen waren die Sporen zu Kolonien angewachsen und konnten auf ihren Genotyp hin untersucht werden. Dazu wurden sie in Wasser resuspendiert und auf entsprechende Selektionsplatten aufgetragen. Der Paarungstyp der haploiden Sporen wurde mittels Kolonie-PCR (siehe 6.4.2.4) bestimmt.

6.2.6 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode

Die Behandlung von Hefezellen mit Alkali-Ionen, z. B. Lithiumacetat, führt dazu, dass die Zellen DNA aufnehmen können (Gietz und Woods, 2002).

Für eine Hefetransformation wurden 2 ml einer wachsenden Zellkultur bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 geerntet und das Pellet zweimal mit je 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand quantitativ abgenommen und die Komponenten des Transformationsansatzes einzeln zugegeben.

Lineare DNA verdünnt in H ₂ O	34 µl
Heringssperma DNA in 1 x TE (1:5 verdünnt)	50 µl
PEG 3350 50% (w/v)	240 µl
LiAc 1 M	36 µl
Gesamt	360 µl

Der Ansatz wurde ca. 20 s mit einem Vortex-Mixer vermischt, dann 20 min bei Raumtemperatur gerollert und schließlich 15 min bei 42°C im Heizblock inkubiert. Danach wurden die Zellen kurz abzentrifugiert (13200 Upm, 30 s), das Pellet in 150 µl sterilem Wasser aufgenommen und auf eine entsprechende Selektionsplatte ausplattiert. Bei der Transformation mit Resistenzmarkern wurden die Zellen vor der Selektion für mindestens 3 h in Vollmedium inkubiert, um die Ausprägung der Resistenzen zu ermöglichen. Nach ca. 3 Tagen Inkubation bei 30°C waren Transformanden angewachsen.

6.2.7 Integration von Plasmid-DNA ins Hefegenom

Die Integration von DNA ins Hefegenom beruht auf homologer Rekombination. Dabei kommt es zum Austausch von homologem Genmaterial am Integrationsort. Die homologe Rekombination ist effizienter bei linearer DNA. Deshalb wurden integrative Plasmide, durch den Verdau mittels Restriktionsendonukleasen (siehe 6.4.3), linearisiert und anschließend eine Hefetransformation (siehe 6.2.6) durchgeführt. Die Integration kann am Genort oder in einem Markergen stattfinden.

6.2.7.1 Integration am Markergen mittels integrativem Plasmid

Integrative Plasmide tragen eine Wildtyp-Kopie eines Markergens, wohingegen die zu transformierenden Hefestämme eine mutierte Kopie enthalten. Durch die Linearisierung des Plasmids entstehen flankierende Markergen-Sequenzen, die für die homologe Rekombination nötig sind. Bei der Integration der integrativen Plasmide entstehen immer eine Wildtyp- und eine mutierte Kopie des Markergens (Abb. 6.1). Durch diese Duplikation des Markergens können Mehrfachintegrationen der Plasmid-DNA auftreten.

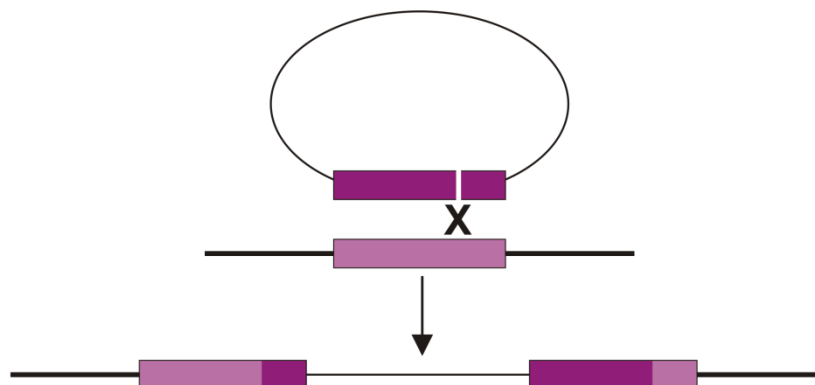


Abbildung 6.1 Integration eines integrativen Plasmids durch homologe Rekombination

Die Wildtyp-Kopie des Markergens ist dunkelviolett und die mutierte Kopie hellviolett dargestellt. Durch die homologe Rekombination wird das Markergen dupliziert (siehe Text).

6.2.7.2 Integration am Markergen mittels *disintegrator* Plasmid

Mit der Integration von *disintegrator* Plasmiden und einer Hefetransformation mit zwei nachfolgenden Selektionsschritten kann eine garantierte Einfachintegration des gewünschten DNA-Konstrukts ins Genom erzeugt werden. Dabei wird das Markergen zerstört und im Gegensatz zur Integration mit integrativen Plasmiden entsteht keine funktionelle Kopie. *Disintegrator* Plasmide sind veränderte integrative Hefepasmide, die neben einem

funktionellen *URA3* Gen zwei Fragmente eines weiteren Markergens (YIp-In und YIp-Out) tragen, zwischen die das zu integrierende DNA-Konstrukt kloniert wird (Abb. 6.2 A; Sadowski *et al.*, 2007). Zur Integration wird das Plasmid in dem YIp-In-Fragment geschnitten und damit ein *ura3*-Stamm transformiert. Nach der Transformation wird zunächst auf *URA3*-Kolonien selektiert (Abb. 6.2 B). Dann werden die Zellen unter nicht selektiven Bedingungen inkubiert, wodurch homologe Rekombination zwischen den Markergen-Fragmenten und dem Markergen stattfinden kann. Nach erfolgter Rekombination ist die zusätzliche *URA3*-Kopie des Plasmids wieder entfernt und die Zellen können auf Medium mit 5-Fluororotsäure (5-FOA) wachsen, da 5-FOA nicht, wie in Gegenwart von Ura3, zu toxischem 5-Fluorouracil umgewandelt wird (2. Selektion, Abb. 6.2 C). Abschließend müssen die gewachsenen Kolonien auf die Integration des Konstrukts getestet werden, da durch die Rekombination entweder Stämme mit integrierter DNA und nicht funktionellem Markergen (Abb. 6.2 C I) oder Stämme mit funktionellem Markergen, aber ohne integrierter DNA entstehen (Abb. 6.2 C II).

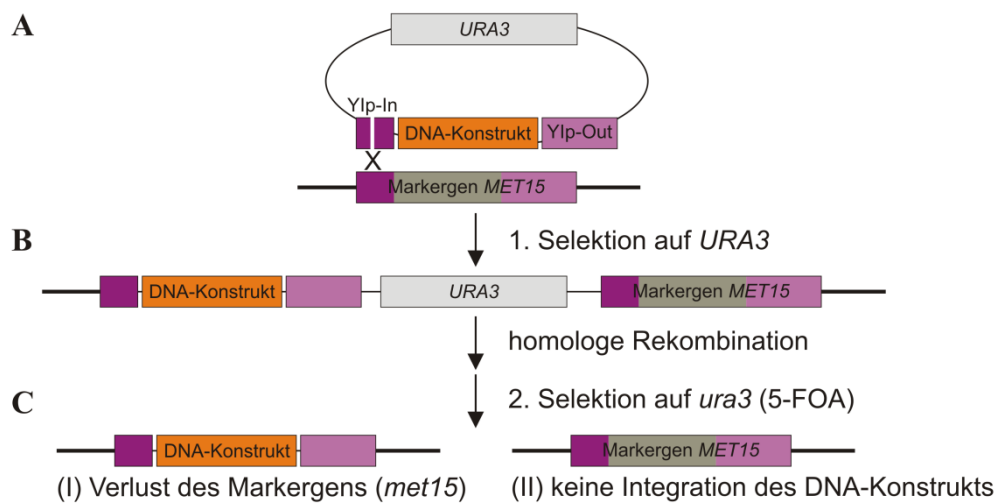


Abbildung 6.2 Einfachintegration eines DNA-Konstrukts mittels *disintegrator* Plasmid [verändert nach (Sadowski *et al.*, 2007)]

Durch die Verwendung spezieller integrativer Plasmide, sog. *disintegrator* Plasmiden und einer doppelten Selektion nach der Hefetransformation werden DNA-Konstrukte einfach unter Zerstörung des Markergens ins Genom integriert. (Für Details siehe Text.)

In dieser Arbeit wurden *disintegrator* Plasmide mit *met15*-Fragmenten verwendet. Nach der Hefetransformation (siehe 6.2.6) von W2015 (*ura3 MET15*) wurden die Zellen auf SD-Uracil-Platten ausplattiert und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die angewachsenen Kolonien erneut auf SD-U ausgestrichen und nochmal 2 – 3 Tage bei 30°C inkubiert. Um die homologe Rekombination zu induzieren, wurden die Zellen auf XYD-

Platten ausgestrichen und 4 Tage bei 25°C inkubiert. Von den XYD-Platten wurden die Zellen dann auf SD++5-FOA-Platten ausgestrichen und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Um falsch positive Zellen zu reduzieren, wurden die gewachsenen Kolonien dann nochmal für 3 Tage bei 30°C auf SD++5-FOA-Platten inkubiert. Zur Identifizierung der positiven Transformanten wurden die Kolonien abschließend auf XYD- und SD-MET-Platten ausgestrichen. Die Kolonien, die nicht auf SD-MET-Platten wachsen konnten, hatten das DNA-Konstrukt in ihr Genom integriert.

6.2.8 Wachstumstest von Hefestämmen mittels Verdünnungsreihe

Um das Wachstumsverhalten von Stämmen unter verschiedenen Bedingungen, wie unterschiedlichen Temperaturen oder unterschiedlichen Medien zu untersuchen, wurde eine Verdünnungsreihe in einer 96-Well Mikrotiterplatte hergestellt. Dazu wurden Übernachtskulturen angezogen und ausgehend von einer OD₆₀₀ von 1 in 200 µl fünf Verdünnungsschritte von je 1:10 durchgeführt. Von dieser Verdünnungsreihe wurden dann mit Hilfe eines Stempels (Frogger) jeweils ca. 3 µl auf Vollmedium- oder Selektionsplatten aufgetragen und die Platten bei entsprechenden Bedingungen für 2 – 3 Tage inkubiert.

6.3 Fixierung, Durchflusszytometrie und Mikroskopie von Hefezellen

6.3.1 Ethanolfixierung von Hefezellen

Hefezellen können mit 70% Ethanol fixiert werden. Dazu wurden 0,25 OD₆₀₀ Zellen abzentrifugiert, in 150 µl Wasser resuspendiert und mit 350 µl Ethanol (100%) gemischt. Im fixierten Zustand können Zellen 1 – 2 Jahre bei 4°C aufbewahrt werden.

6.3.2 DNA-Färbung mit Sytox Green und Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der DNA-Gehalt ethanolfixierter Zellen festgestellt und das Zellteilungsstadium ermittelt (Haase und Lew, 1997). Dabei wurde die DNA mit dem Fluorochrom Sytox Green angefärbt. Ethanolfixierte Zellen (0,25 OD₆₀₀) wurden in 1 ml Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen, in 250 µl Natriumcitrat-Puffer aufgenommen und mit Ultraschall (5 Pulse bei 40% Leistung) behandelt, um die durch das Fixieren entstandenen Zellaggregate wieder aufzulösen. Zu den vereinzelter Zellen wurden 10 µl RNase A (10 mg/ml) gegeben und 1 h bei 50°C im Thermomixer inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurden die Zellen eine weitere Stunde bei 50°C

geschüttelt und danach abzentrifugiert (13200 Upm, 1 min). Nach dem Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in 250 µl Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) mit 1 µM Sytox Green resuspendiert und mindestens über Nacht bei 4°C im Dunkeln gefärbt.

Bis Februar 2010 (siehe Abb. 4.1, 4.10, 4.11, 4.19 A) wurden die Messung am Durchflusszytometer CA-III (Partec) durchgeführt. Dazu wurden 5 – 20 µl der Probe in 1,5 ml Tris/HCl (50 mM, pH 7,5) verdünnt, so dass ca. 300 Ereignisse pro Sekunde gemessen wurden. Es wurden 15000 – 20000 Zellen im Kanal FL2 (Gain: 550, x-Achse: linear) gemessen.

Alle weiteren Messungen wurden am Durchflusszytometer CyFlow Space (Partec) durchgeführt. Hierfür wurden 20 µl der Probe in 1 ml Tris/HCl (50 mM, pH 7,5) verdünnt und im Kanal FL1 (Gain: 565, x-Achse: linear) gemessen.

Die DNA-Profile wurden mit der Software WinMDI 2.8 dargestellt. Für die Quantifizierung des Anteils der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen wurde die Software FCS Express 4 verwendet.

6.3.3 Mikroskopie von lebenden Zellen

Um die Lokalisation und Degradation von GFP- und mCherry-markierten Proteinen in lebenden Hefezellen zu beobachten, wurden Zellen einer wachsenden Kultur geerntet (2000 Upm, 2 min) und der Überstand verworfen. Von den geernteten Zellen wurden 3 µl auf ein Deckglas (24 x 60 mm) pipettiert und mehrmals resuspendiert, um die Zellen gut zu verteilen. Dann wurden die Zellen mit SD++-Agar bzw. SRG++-Agar und einem Deckglas (18 x 18 mm) bedeckt.

SD++-Agar	0,75% Agarose in H ₂ O	10,5 ml
	20% Glukose	1,5 ml
	10 x YNB	1,5 ml
	10 x Dropout++	1,5 ml
SRG++-Agar	1% Agarose in H ₂ O	8,5 ml
	10% Raffinose	3,0 ml
	20% Galaktose	0,5 ml
	10 x YNB	1,5 ml
	10 x Dropout++	1,5 ml

Die Präparate wurden am inversen Mikroskop Observer Z.1 mit *spinning disc*-System und einer AxioCam MRm bei 20 – 22°C mikroskopiert. Es wurden Z-Stapel aus 10 Ebenen mit einem Abstand von je 0,5 µm und einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Für Zeitrafferaufnahmen wurden die Z-Stapel im Abstand von 5 min für eine Dauer von 120 min erzeugt und anschließend zu einem Film zusammengefügt. GFP-Signale wurden mit dem 488 nm Laser und mCherry-Signale mit dem 561 nm Laser detektiert. Die Intensität der Laser richtete sich je nach zu untersuchendem Signal. Zur Visualisierung des Zellkerns wurde häufig das Fusionsprotein mCherry-NLS verwendet. Als NLS diente der C-terminale Bereich von Swi5 (AS 569-709), in dem die Cdk1-Phosphorylierungsstellen mutiert wurden (S646A und S664A), da diese ansonsten den Kernimport verhindern (Moll *et al.*, 1991). An den C-Terminus des Fusionsproteins war zusätzlich ein MYC13-Epitop fusioniert. Das Fusionsprotein wurde konstitutiv (*pTEF2*) exprimiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Axio Vision LE Rel. 4.8 und Image J. Zur Quantifizierung von Signalintensitäten wurden die Z-Stapel durch Aufsummierung der Signale projiziert und der Hintergrund subtrahiert. Zur Darstellung der Signale wurden die Ebenen mit der Einstellung „maximale Intensität“ projiziert.

6.4 Genetische und molekularbiologische Methoden

6.4.1 Präparation von genomischer DNA aus Hefezellen

Die Isolierung genomischer DNA beruht auf der mechanischen Zerstörung der Zellwand, der anschließenden Zelllyse durch Detergenzbehandlung und der alkoholischen Fällung der DNA (Cryer *et al.*, 1975; Fujimura und Sakuma, 1993).

Von einer Übernachtskultur wurden 5 ml geerntet (2000 Upm, 2 min), das Pellet in 1 ml Wasser aufgenommen und anschließend auf ca. 0,3 g Glasperlen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Tris/EDTA/SDS (Tris/HCl pH 7,5 50 mM; EDTA 20 mM; SDS 10 mg/ml) resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 min in der Retsch-Mühle bei 4°C mit einer Frequenz von 30/s gerüttelt. Nach Zugabe von 500 µl der Tris/EDTA/SDS-Lösung wurde die Suspension 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend mit 200 µl 5 M Kaliumacetat versetzt. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis gestellt und 5 min bei 13200 Upm und 4°C zentrifugiert. Die sich nun im Überstand befindende genomische DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und um die DNA zu fällen, 1 ml 100% Ethanol zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren des Ansatzes wurde die DNA abzentrifugiert, ca. 15 min getrocknet und schließlich in 300 µl 1 x TE-Puffer gelöst. Die mitaufgereinigte RNA

wurde durch Zugabe von 5 µl RNase A (10 mg/ml) und Inkubation bei 65°C für 30 min abgebaut. Die anschließende erneute Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 500 µl 100% Isopropanol. Nachdem das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und ca. 15 min getrocknet wurde, wurde die DNA schließlich in 50 µl 1 x TE-Puffer (65°C) gelöst. Zur Kontrolle wurden 3 µl DNA-Lösung auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 6.4.4).

6.4.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente (Mullis *et al.*, 1986). Der zu amplifizierende Bereich wird durch Verwendung von Oligonukleotidprimern definiert, die zu Bereichen des Zielfragments komplementär sind. Der Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase erlaubt die exponentielle Vermehrung der DNA im PCR-Thermocycler. Als Polymerasen dienten die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* für analytische Zwecke und die KOD-Polymerase aus *Thermococcus kodakaraensis*, welche, im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase, über eine Korrekturleseaktivität verfügt, für präparative Zwecke. Als Template wurden isolierte genomische DNA (6.4.1), Plasmid-DNA (6.4.7.2) oder direkt Hefekolonien verwendet. Anwendung fand die PCR bei der Klonierung bestimmter Gene und Gen-Fragmente in Vektoren, bei der Genommanipulation (C-terminale Epitopmarkierung) und bei der gezielten Mutagenese von *CDC5*. Analytisch wurde mit Hilfe der PCR der Paarungstyp von Hefezellen bestimmt.

6.4.2.1 PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Diese Methode wurde präparativ eingesetzt, um Gene oder Gen-Fragmente aus dem Hefe-Genom oder aus einem Plasmid für Klonierungen zu amplifizieren. Dazu wurden Oligonukleotidprimer eingesetzt, an deren Enden zusätzlich Restriktionsschnittstellen angefügt wurden, um sie spezifisch in einen vorgesehenen Vektor klonieren zu können.

Reaktionsansatz

10 x KOD Hot Start DNA Polymerase Puffer	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
Primer <i>forward</i> (10 pmol/µl)	3 µl
Primer <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	3 µl

KOD Hot Start DNA Polymerase (1 U/μl)	1 μl
Template DNA	0,5 – 1 μl
H ₂ O	<i>ad</i> 50 μl

Temperaturprofil

Denaturierung	94°C	4 min
25 Zyklen	Denaturierung	94°C 30 s
	Annealing	54°C 30 s
	Amplifikation	72°C 1 kb/40 s
Restamplifikation	72°C	5 min

Die Annealingtemperatur, die Anzahl der Zyklen sowie die Amplifikationszeit wurden an die Primer, das Template und an die Länge des zu amplifizierenden Fragments angepasst. Die Menge der eingesetzten Template-DNA-Lösung war von deren Konzentration abhängig.

6.4.2.2 PCR zur Genommanipulation

Mit dieser PCR wurden lineare DNA-Fragmente amplifiziert, um mittels homologer Rekombination Proteine mit einem Epitop (HA3 oder MYC13) oder GFP zu markieren. Für die C-terminale Epitopmarkierung wurde das pFA6a-System und für die GFP-Markierung das pFA6a-link-System verwendet (Longtine *et al.*, 1998; Sheff und Thorn, 2004). Zu diesem Zweck wurden die Oligonukleotidprimer so konstruiert, dass sie jeweils 50 Basen homolog zu dem Integrationsort im Hefegenom und 20 Basen homolog zu der zu amplifizierenden Sequenz des pFA6a-Plasmids waren. Anschließend wurden die Hefezellen direkt mit dem erhaltenen PCR-Produkt (10 – 15 μl) transformiert (siehe 6.2.6).

Reaktionsansatz

10 x KOD Hot Start DNA Polymerase Puffer	5 μl
MgSO ₄ (25 mM)	6 μl
dNTP-Mix (2 mM)	5 μl
Primer <i>forward</i> (10 pmol/μl)	3 μl
Primer <i>reverse</i> (10 pmol/μl)	3 μl
KOD Hot Start DNA Polymerase (1U/μl)	1 μl
Template DNA	0,5 – 1 μl
H ₂ O	<i>ad</i> 50 μl

Temperaturprofil pFA6a-System

Denaturierung		94°C	4 min
25 Zyklen	Denaturierung	94°C	1 min
	Annealing	56°C	1 min
	Amplifikation	72°C	1 kb/min
Restamplifikation		72°C	10 min

Temperaturprofil pFA6a-link-System

Denaturierung		95°C	5 min
25 Zyklen	Denaturierung	95°C	30 s
	Annealing	62°C	30 s
	Amplifikation	72°C	1 kb/min
Restamplifikation		72°C	5 min

6.4.2.3 Gezielte Mutagenese eines Gens mittels PCR

Die hier verwendete Methode zur gezielten Mutagenese bedient sich einer speziellen linearen Amplifikation von DNA (Papworth *et al.*, 1996). Dabei wird ein gesamtes Plasmid, das nicht größer als ca. 10 kb sein sollte, amplifiziert. Die verwendeten mutagenen Primer tragen die gewünschte Mutation und binden an die entsprechende Stelle des Gens. Das Primerpaar ist auf seiner ganzen Länge komplementär zueinander und ca. 50 Basen lang. Nach der Amplifizierung ergibt sich ein Gemisch aus ursprünglichen und neusynthetisierten Plasmiden. Da die verwendete Matrize aus dem *E. coli*-Stamm DH5 α isoliert wurde, der aktive DNA-Methylasen besitzt, ist sie im Gegensatz zu den neusynthetisierten Plasmiden methyliert (5'-GA^mTC-3'). Das Restriktionsenzym *DpnI* erkennt und schneidet spezifisch die Sequenz 5'-GA^mTC-3', wodurch beim Verdau des gesamten Mutageneseansatzes mit *DpnI* nur die Matrize geschnitten und somit die Ausbeute an neusynthetisierten Plasmiden erhöht wird. Üblicherweise wurde durch die eingefügte Mutation zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle kreiert oder zerstört, wodurch mittels Restriktionsverdau mutierte von ursprünglichen Plasmiden unterschieden werden konnten.

Reaktionsansatz

10 x KOD Hot Start DNA Polymerase Puffer	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	6 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
Primer <i>forward</i> (10 pmol/µl)	3 µl
Primer <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	3 µl
KOD Hot Start DNA Polymerase (1U/µl)	1,5 µl
Template DNA	100 ng
H ₂ O	<i>ad</i> 50 µl

Temperaturprofil

Denaturierung	94°C	4 min
20 Zyklen	Denaturierung	94°C 1 min
	Annealing	58°C 1 min
	Amplifikation	72°C 5 min 20 s
Restamplifikation	72°C	5 min

Nach der PCR-Reaktion wurde der gesamte Ansatz für 2 h mit 10 U *DpnI* bei 37°C verdaut und 5 µl des dialysierten Verdauansatzes für die Transformation von *E. coli* DH5α-Zellen (siehe 6.1.2.2) eingesetzt.

6.4.2.4 Paarungstyp-Bestimmung mittels Kolonie-PCR

Für die Bestimmung des Paarungstyps mittels PCR (Huxley *et al.*, 1990) wurde eine geringe Zellmenge mit einer sterilen Pipette direkt von der Agarplatte aufgenommen und im Reaktionsansatz resuspendiert. Auf die Isolierung von genomischer DNA konnte verzichtet werden, da der Kolonie-Puffer (125 mM Tris/HCl pH 8,5; 560 mM KCl) in diesem System den Aufschluss der Zellen ausreichend übernehmen kann.

Reaktionsansatz

10 x Kolonie-Puffer	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (2 mM)	2,5 µl
Primer-Mix aus WS826/827/828 (10 pmol/µl)	3 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 25 µl

Temperaturprofil

Denaturierung		94°C	4 min
35 Zyklen	Denaturierung	94°C	1 min
	Annealing	55°C	1 min
	Amplifikation	72°C	40 s
Restamplifikation		72°C	3 min

Nach der Amplifikation wurde das PCR-Produkt im Agarosegel analysiert. *MATa*-Zellen ergeben ein DNA-Produkt von 544 bp und *MATα*-Zellen ein Produkt von 404 bp. Handelt es sich um diploide Zellen, werden beide Fragmente amplifiziert.

6.4.3 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden spezifisch doppelsträngige DNA, wobei lineare DNA-Fragmente mit überhängenden oder glatten Enden entstehen. Für einen DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen wurde folgender Ansatz verwendet:

DNA	0,5 – 1 µg
10 x Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzyme	je 5 – 10 U
H ₂ O	ad 20 µl

Der Restriktionspuffer, die Inkubationstemperatur und die Zugabe von BSA wurden entsprechend den gewählten Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben (NEB, Roche) verwendet. Die Inkubation dauerte 1 – 2 Stunden.

6.4.4 Gelelektrophorese von DNA

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld in einem Agarosegel aufgetrennt. Sie dient der Reinheitsprüfung, Identifizierung, Größenbestimmung und Trennung von Restriktions- und PCR-Fragmenten. Dazu wurde 0,7 – 2% Agarose in 1 x TAE aufgekocht, mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine dafür vorgesehene Form (Hoefer) gegossen, wobei ein Kamm zur Aussparung der Probestaschen diente. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, die dadurch mittels UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Kammer überführt, die zu untersuchende DNA mit Auftragspuffer

versetzt und in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert. Als Referenz wurde der GeneRuler™ DNA Längenstandard von Fermentas verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V.

6.4.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

6.4.5.1 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach dem Ausschneiden der DNA-Banden aus Agarosegelen erfolgte die Isolierung der DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN. Die Durchführung entsprach dem Standardprotokoll des Herstellers.

6.4.5.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionsverdau

Die Aufreinigung gewünschter DNA-Fragmente von Oligonukleotiden, Nukleotiden, Enzymen und Puffern nach einer PCR oder nach einem Restriktionsverdau, bei dem nur kurzkettige Nukleotide abgespalten wurden, erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma QIAGEN. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

6.4.6 Ligation

Lineare DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden, die durch den Restriktionsverdau entstanden sind, können mit Hilfe von Ligasen kovalent verknüpft werden. Die relative Menge der dafür eingesetzten Vektor- und Insert-Fragmente wurden anhand der Bandenintensität nach der Gelelektrophorese und unter Berücksichtigung der Größe der Fragmente abgeschätzt. Es wurde ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:5 eingesetzt und folgender Ansatz verwendet:

Vektor-DNA	50 – 100 ng
Insert-DNA	5fache Kopienzahl des Vektors
T4-DNA-Ligase	1 U
10 x Ligasepuffer	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Die Ligation wurde bei Raumtemperatur für mindestens 2 Stunden oder über Nacht durchgeführt. Zur Vermehrung der Plasmide wurden *E. coli* DH5α-Zellen mit dialysiertem Ligationsansatz transformiert (siehe 6.1.2.2) und anschließend wieder isoliert (siehe 6.4.7).

6.4.7 Plasmidpräparation aus *E. coli*

6.4.7.1 Plasmidschnellisolierung

Diese Methode wurde verwendet, um schnell Plasmide mit hoher Kopienzahl aus *E. coli* zu isolieren (Berghammer und Auer, 1993). Die isolierte Plasmid-DNA eignet sich für Restriktionsanalysen, ist jedoch aufgrund einer hohen Proteinverunreinigung nicht zur Aufbewahrung oder zum Sequenzieren geeignet. Von einer Übernachtskultur wurden 2 ml bei 13200 Upm in einem Reaktionsgefäß für 4 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 µl EasyPrep-Puffer resuspendiert, 1 min bei 100°C aufgekocht und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach dem abschließenden Zentrifugieren (13200 Upm, 15 min) befand sich die Plasmid-DNA im Überstand. Für einen Restriktionsverdau wurden 1 bis 3 µl des Überstandes eingesetzt.

6.4.7.2 Säulenreinigung von Plasmid-DNA

Zur Aufbewahrung und zum Sequenzieren wurde die aus *E. coli* isolierte Plasmid-DNA über Säulen aufgereinigt. Für die Säulenreinigung im kleinen Maßstab (2 ml Kultur, 50 µl Ausbeute) wurde der Minipräparationskit NucleoSpin® der Firma Macherey-Nagel verwendet. Für die Aufreinigung großer Mengen Plasmid-DNA (80 ml Kultur, 500 – 1000 µl Ausbeute) wurden der JETSPIN Plasmid Midi Kit von Genomed, der QIAGEN Plasmid Midi Kit von QIAGEN oder der GenElute™ HP Plasmid Midi Kit von Sigma-Aldrich verwendet. Die Durchführung entsprach jeweils den Angaben des Herstellers.

6.4.8 Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrads einer DNA-Lösung

Die Konzentration der doppelsträngigen DNA wurde photometrisch durch die Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Auskunft über den Reinheitsgrad der DNA-Lösung gab der Quotient aus den Extinktionen bei 260 nm und 280 nm, welcher in reinem Probenzustand bei 1,8 liegt.

6.4.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle von PCR-Produkten eingesetzt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt und die DNA-Sequenzen mit Hilfe der Software Bio Edit Sequence Alignment Editor analysiert.

6.5 Proteinanalytische Methoden

6.5.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Hefezellen

Proteinextrakte wurden durch einen mechanischen Aufschluss der Hefezellen mit Hilfe von Glasperlen hergestellt. Dazu wurden mindestens 12 OD₆₀₀-Hefezellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur in Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (2000 Upm, 2 min) und das Pellet in 1 ml eiskaltem Wasser aufgenommen. Nach dem Überführen in ein Schraubdeckelgefäß mit 0,3 g Glasperlen, wurden die Zellen bei -70°C schockgefroren. Für den Zellaufschluss wurden die Proben dann auf Eis aufgetaut, 150 µl Puffer 3 mit β-Glycerolphosphat (60 mM) zugegeben und im Kühlraum in der Retsch-Mühle 5 min bei maximaler Frequenz geschüttelt. Anschließend wurden die Zellfragmente 3 min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 50 µl mit 50 µl 2 x Lämmli-Auftragspuffer gemischt und für 10 min bei 100°C inkubiert.

6.5.2 Proteinkonzentrations-Bestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration eines Extrakts wurden 5 µl des Lysat-Überstandes 1:1000 in Wasser verdünnt. Von der Verdünnung wurden 500 µl 1:2 mit Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur von 5 min wurde die OD₅₉₅, die als Maß für die Proteinkonzentration dient, gemessen. Als Referenz für die photometrische Messung wurde ein 1:2 in Wasser verdünntes Bradford-Reagenz verwendet. Durch die Bestimmung der relativen Proteinkonzentrationen war eine gleichmäßige Probenbeladung des SDS-Gels möglich.

6.5.3 Immunpräzipitation

Mittels Immunpräzipitation (IP) können gezielt einzelne Proteine aus einem Proteinrohextrakt aufgereinigt werden. Dazu wird ein Antikörper eingesetzt, der spezifisch gegen das Zielprotein oder die Epitopmarkierung des Zielproteins gerichtet ist. Protein A aus *Staphylococcus aureus* bindet spezifisch die schwere Kette eines Antikörpers. Durch Kopplung von Protein A an eine Agarose-Matrix kann somit das Zielprotein präzipitiert werden. Proteine, die mit dem Zielprotein interagieren, werden in der IP ebenfalls präzipitiert (Co-Immunpräzipitation, CoIP). Mittels anschließender Westernblot-Analyse lässt sich dann die Interaktion der Proteine durch Detektion des Co-Präzipitats nachweisen.

Für die Durchführung der IP wurden 50 OD₆₀₀-Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur in mehreren Falcon-Röhrchen geerntet (2000 Upm, 2 min) und das Pellet in 1 ml kaltem Wasser aufgenommen. Die Zellsuspension aus einem Falcon wurde in ein Schraubdeckelgefäß mit 0,6 g Glaskügelchen überführt, kurz zentrifugiert und das Wasser abgenommen. Falls die geernteten Zellen nicht sofort weiter verarbeitet worden sind, wurden sie bei -70°C eingefroren und aufbewahrt. Es wurde stets auf Eis gearbeitet, um die Degradation von Proteinen durch Proteasen zu vermeiden.

Zur Herstellung der Proteinrohextrakte wurden die Zellen gegebenenfalls auf Eis angetaut und mit je 300 µl Puffer 3 mit β-Glycerolphosphat (60 mM) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte in der Retsch-Mühle für 5 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit. Danach wurden die Zellfragmente bei 4°C und 14000 Upm für 10 min abzentrifugiert, die Überstände identischer Ansätze in einem frischen Schraubdeckelgefäß vereinigt und nochmals zentrifugiert (4°C, 14000 Upm, 15 min). Anschließend wurden die Überstände erneut in frische Schraubdeckelgefäße überführt und für eine spätere Westernblot-Analyse 25 µl des Überstands mit 25 µl 2 x Lämmli-Auftragspuffer bei 100°C für 10 min aufgeköcht. Außerdem wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (siehe 6.5.2) bestimmt, um die Ansätze auf eine gleiche Proteinmenge einzustellen. Es wurden in der Regel 150 – 200 OD₅₉₅ Protein eingesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 500 µl mit Puffer 3 (60 mM β-Glycerolphosphat) aufgefüllt. Dann wurde zu den Proben 100 µl des α-myc-Antikörpers 9E10 gegeben und die Ansätze 2 h bei 4°C inkubiert. Zur Ausfällung der gebildeten Immunkomplexe wurde jeder Ansatz mit 40 µl Protein A-Agarose-Kügelchen versetzt, die zuvor zweimal mit 1 ml Puffer 3 (60 mM β-Glycerolphosphat) gewaschen wurden. Die Ansätze wurden 2 h bei 4°C gerollert. Abschließend wurde das Präzipitat dreimal mit 1 ml Puffer 3 (60 mM β-Glycerolphosphat) gewaschen und nach dem letzten Waschschrift der Überstand mit Hilfe einer Hamilton-Spritze vollständig entfernt. Zu dem Präzipitat wurde 40 µl 1 x Lämmli-Auftragspuffer gegeben und 10 min bei 100°C inkubiert. Die präzipitierten Proteine und deren co-präzipitierten Interaktionspartner wurden in einer nachfolgenden Westernblot-Analyse nachgewiesen.

6.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE können Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden (Lämmli, 1970). Dies geschieht unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen, da durch SDS und β-Mercaptoethanol sowohl die Sekundärstruktur der Proteine als auch Protein-Protein-Wechselwirkungen zerstört werden. β-Mercaptoethanol

reduziert die Disulfidbrücken, während negativ geladenes SDS durch Anlagerung an die Proteine ihnen eine negative Gesamtladung verleiht. Somit wandern die Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung im elektrischen Feld zur Anode, wobei kleine Proteine schneller im Polyacrylamidgel wandern als große Proteine. Die Polyacrylamidgele bestehen aus einem Sammelgel und einem Trenngel (diskontinuierliche SDS-PAGE). Der unterschiedliche pH-Wert der Puffer und die unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen von Sammel- und Trenngel bewirken, dass sich die Proben beim Eintritt in das Trenngel in einer Bande konzentrieren und somit die Auftrennung der Proteine gleichzeitig beginnt.

Als erstes wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten, die durch einen Gummi abgedichtet wurden, gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Zur Aussparung der Probenaschen wurde ein Kamm in das Sammelgel gesteckt. Je nach Proteingröße wurde ein 7%iges oder 9%iges Trenngel verwendet. Die Gele wurden stets mit äquivalenten Proteinmengen ($1 - 3 \text{ OD}_{595} = 15 - 40 \mu\text{g}$) beladen. Das aufzutragende Volumen in μl wurde anhand der gemessenen Proteinmengen mittels Bradford-Test (siehe 6.5.2) wie folgt berechnet: $1 \text{ OD}_{595} [\mu\text{l}] = 1/\text{gemessene OD}_{595}$. Als Größenstandard wurde der ColorPlus Proteinmarker von NEB verwendet. Die anschließende Gelelektrophorese wurde mit einer Stromstärke von $15 - 20 \text{ mA}$ pro Gel durchgeführt und gestoppt, sobald die blaue Bande des Lämmli-Auftragspuffers das Gel verlassen hat. Anschließend wurde das Trenngel für einen Westernblot weiter verwendet.

6.5.5 Westernblot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Die Westernblot-Analyse dient dazu, Proteine spezifisch in Bezug auf ihre Auftrennung im Polyacrylamidgel nachzuweisen. Dabei werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Towbin *et al.*, 1992) und anschließend mittels Antikörpern detektiert. Dazu wird zunächst ein spezifischer primärer Antikörper an das gewünschte Protein oder dessen fusioniertes Epitop gebunden, an den wiederum ein sekundärer Antikörper bindet, der an einen Infrarot-Farbstoff gekoppelt ist. Mit Hilfe des Odyssey Infrared Imagers (LI-CORE) kann dann die Fluoreszenz des Farbstoffs angeregt und detektiert werden. Das detektierte Fluoreszenzsignal ist proportional zur Proteinkonzentration, wodurch eine quantitative Auswertung möglich ist.

Zum Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran wurde als erstes ein mit Transferpuffer getränktes Whatman GB005 Papier auf die Graphitanode der Elektroblopparatur gelegt. Als Nächstes folgte die in Transferpuffer getränkte

Nitrocellulose-Membran, dann das ebenfalls in Transferpuffer getränkte Gel und zuletzt ein weiteres, in Transferpuffer getränktes Whatman GB005 Papier. Durch Auflegen der Kathode wurde die Apparatur abgeschlossen. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 40 mA pro Gel für 70 – 90 min. Danach wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt, um die gleichmäßige Beladung und den Transfer auf die Membran zu überprüfen und zu dokumentieren. Um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu blockieren, wurde die Membran anschließend für mindestens 1 h in TBS-T Milch (5% Magermilchpulver in TBS-T) geschwenkt. Danach folgte über Nacht die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper in TBS-T Milch bei 4°C auf einer Wippe. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 5 min unter Schwenken bei Raumtemperatur mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper (in TBS-T Milch verdünnt) für mindestens 2 h bei Raumtemperatur auf einer Wippe abgedunkelt inkubiert. Danach wurde erneut dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Der spezifische Nachweis der Proteine erfolgte durch Anregung und Detektion der Fluorophor-gekoppelten Antikörper (700 nm bzw. 800 nm) mit dem Odyssey Infrared Imager der Firma LI-COR. Die Quantifizierung der Signale wurde anschließend mit Hilfe der Odyssey Application Software durchgeführt.

7 Material

7.1 Hefestämme

Tabelle 7.1 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme

(SH: Stammhintergrund, Sammlung: Stammsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Seufert)

Stamm	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	S288C	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
K699	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,-15 leu2-3,-112 trp1-1 ura3-2 ssd1</i>	W303	Sammlung
K1890	<i>MATa clb2-Δ::LEU2</i>	W303	Sammlung
W1301	<i>MATa bar1-Δ::HIS3</i>	W303	Sammlung
W2015	<i>MATa/α CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W4754	<i>MATa CDC14-HA10-LEU2</i>	W303	Sammlung
W6842	<i>MATa bar1-Δ::HIS3 leu2::pCDC5-CDC5-MYC9-LEU2</i>	W303	Sammlung
W6844	<i>MATa bar1-Δ::HIS3 leu2::pCDC5-cdc5ΔN72-MYC9-LEU2</i>	W303	Sammlung
W6856	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-CDC5-MYC9-LEU2</i>	W303	Sammlung
W8097	<i>MATa/α CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2/ leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8098	<i>MATa/α CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2/ leu2::pCDC5-cdc5pm1/2/4/5-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8099	<i>MATa/α CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2/ leu2::pCDC5-cdc5pm4-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8100	<i>MATa/α CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2/ leu2::pCDC5-cdc5pm5-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8101	<i>MATa/α CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2/ leu2::pCDC5-cdc5pm4/5-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8176	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8180	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm4-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8182	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit

MATERIAL

	<i>leu2::pCDC5-cdc5pm5-MYC9-LEU2</i>		
W8184	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2::pCDC5-cdc5pm4/5-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8186	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2::pCDC5-cdc5pm1/2/4/5-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8393	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W8394	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W8395	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W8396	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W8425	<i>MATa his3::pGAL1-FLAG3-MPS1-tCYC1-HIS3</i>	W303	Sammlung
W8483	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4 cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-CDC5-MYC9-LEU2 SCC1-HA3-natMX4</i>	W303	diese Arbeit
W8485	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4 cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9-LEU2 SCC1-HA3-natMX4</i>	W303	diese Arbeit
W8492	<i>MATa/α CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2/ leu2::pCDC5-cdc5pm1/2D-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8493	<i>MATa/α CDC5/cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2/ leu2::pCDC5-cdc5pm1/2E-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8622	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2::pCDC5-cdc5pm1/2D-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8624	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2::pCDC5-cdc5pm1/2E-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W8626	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>met15::pCDC5-cdc5pm1/2D-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W8627	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>met15::pCDC5-cdc5pm1/2D-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W8753	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4 cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-CDC5-MYC9-LEU2 BFA1-HA3-natMX4</i>	W303	diese Arbeit
W8754	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4 cdc5-Δ::HIS3MX6 leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9-LEU2 BFA1-HA3-natMX4</i>	W303	diese Arbeit
W9248	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-GFP-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W9250	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit

MATERIAL

	<i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-tCYC1-URA3</i>		
W9312	<i>MATa leu2::pTEF2-MYC3-cdc5N80-GFP-tCYC1-LEU2</i> <i>ura3::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-URA3</i>	W303	Sammlung
W9600	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80db1/2-GFP-tCYC1-URA3</i>	W303	Sammlung
W9601	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80KENm-GFP-tCYC1-URA3</i>	W303	Sammlung
W9703	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80pm1/2-GFP-tCYC1-URA3</i>	W303	Sammlung
W9763	<i>MATa CDC14-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i>	W303	Sammlung
W9730	<i>MATa ura3::pCDC14-CDC14-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i>	W303	Sammlung
W10318	<i>MATa CDC14-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W10319	<i>MATa CDC14-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W10413	<i>MATa CDC14-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2D-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W10425	<i>MATa CDC5-GFP-CaURA3</i>	W303	diese Arbeit
W10510	<i>MATa cdc5-1 CDC14-GFP-tCYC1URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W10511	<i>MATa cdc5-1 ura3::pCDC14-CDC14-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W10514	<i>MATa ura3::pCDC14-CDC14-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W10515	<i>MATa ura3::pCDC14-CDC14-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W10531	<i>MATa MAD2-HA3-HIS3MX6 MYC18-CDC20-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W10535	<i>MATa CDC5-GFP-CaURA3</i>	W303	diese Arbeit

MATERIAL

	<i>trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>		
W10622	<i>MATa MAD2-HA3-HIS3MX6 MYC18-CDC20-TRP1</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W10653	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2::pCDC5-CDC5-GFP-tADH1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W10657	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-GFP-tADH1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W10661	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2::pCDC5-cdc5pm1/2D-GFP-tADH1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W10787	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2::pCDC5-CDC5-GFP-tADH1-LEU2</i> <i>trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W10788	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-GFP-tADH1-LEU2</i> <i>trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W10789	<i>MATa cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2::pCDC5-cdc5pm1/2D-GFP-tADH1-LEU2</i> <i>trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W10791	<i>MATa bfa1-Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W10792	<i>MATa bfa1-Δ::kanMX4</i>	W303	diese Arbeit
W10799	<i>MATa CDC14-HA4-LEU2</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W10800	<i>MATa CDC14-HA4-LEU2</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-cdc5K110M-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W10801	<i>MATa CDC14-HA4-LEU2</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-cdc5ΔN72-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W10802	<i>MATa CDC14-HA4-LEU2</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-cdc5pm1/2-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W10803	<i>MATa CDC14-HA4-LEU2</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-cdc5pm1/2D-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W10846	<i>MATa ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i> <i>PDS1-HA6-HIS3 SIC1-MYC13-HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W10881	<i>MATa bfa1-Δ::kanMX4 CDC5-GFP-CaURA3</i> <i>trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W10882	<i>MATa bfa1-Δ::kanMX4 cdc5-Δ::HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit

MATERIAL

	<i>leu2::pCDC5-CDC5-GFP-tADH1-LEU2</i> <i>trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>		
W10883	<i>MATa bfa1-Δ::kanMX4 cdc5-Δ::HIS3MX6</i> <i>leu2::pCDC5-cdc5pm1/2-GFP-tADH1-LEU2</i> <i>trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W10982	<i>MATa hct1-4::HIS3 leu2::pTEF2-MYC3-cdc5N80-GFP-</i> <i>tCYC1-LEU2 ura3::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W10983	<i>MATa cdc14-3 MAD2-HA3-HIS3MX6 MYC18-CDC20-</i> <i>TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W10986	<i>MATa CDC14-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i> <i>cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-CDC5-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W10987	<i>MATa CDC14-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i> <i>cdc5-Δ::HIS3MX6 met15::pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9</i>	W303	diese Arbeit
W10990	<i>MATa CDC14-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W11075	<i>MATa PDS1-HA6-HIS3 SIC1-MYC13-HIS3MX6</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3 hct1-Δ::LEU2</i>	W303	Sammlung
W11076	<i>MATa PDS1-HA6-HIS3 SIC1-MYC13-HIS3MX6</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3 cdc16-1</i>	W303	Sammlung
W11077	<i>MATa PDS1-HA6-HIS3 SIC1-MYC13-HIS3MX6</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3 cdc14-3</i>	W303	Sammlung
W11082	<i>MATa hct1-Δ::LEU2 MAD2-HA3-HIS3MX6 MYC18-</i> <i>CDC20-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W11085	<i>MATa trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W11242	<i>MATa PDS1-HA6-HIS3 SIC1-MYC13-HIS3MX6</i>	W303	Sammlung
W11276	<i>MATa MAD1-MYC13-TRP1 MAD2-HA3-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W11277	<i>MATa MAD1-MYC13-TRP1 MAD2-HA3-HIS3MX6</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W11314	<i>MATa trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80db1/2-GFP-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W11315	<i>MATa trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80KENm-GFP-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit

MATERIAL

W11440	<i>MATa MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W11441	<i>MATa MAD2-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W11443	<i>MATa trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-NES-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W11546	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-NES-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W11594	<i>MATa MAD1-GFP-CaURA3 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W11648	<i>MATa NDC80-GFP-tCYC1-URA3 trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W11831	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HMO1-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W11837	<i>MATa MAD3-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W11838	<i>MATa BUB3-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W11840	<i>MATa MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 his3::pGAL1-FLAG3-MPS1-tCYC1-HIS3</i>	W303	diese Arbeit
W11889	<i>MATa trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HMO1-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W11896	<i>MATa MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2</i>	S288C	diese Arbeit
W11897	<i>MATa MAD2-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2</i>	S288C	diese Arbeit
W11898	<i>MATa MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2 mad2-Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W11899	<i>MATa MAD2-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2 mad1-Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W11986	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HMO1-tCYC1-URA3 NOP56-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W11995	<i>MATa trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1 ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit

MATERIAL

W11999	<i>MATa trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-GFP-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12181	<i>MATa PDS1-HA6-HIS3 SIC1-MYC13-HIS3MX6</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i> <i>pMET3-HA3-CDC20-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W12182	<i>MATa MAD2-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2</i> <i>cdc20:: natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288C	diese Arbeit
W12188	<i>MATa slk19-Δ::HIS3MX6 MAD1-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12193	<i>MATa ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i> <i>MPS1-MYC13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W12197	<i>MATa MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2</i> <i>cdc20:: natNT2-pGALL-CDC20</i>	S288C	diese Arbeit
W12234	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-GFP-NLS-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12235	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HTB1-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12236	<i>MATa bar1-Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HHO1-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12238	<i>MATa SLK19-GFP-CaURA3 trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12243	<i>MATa NDC80-GFP-tCYC1-URA3</i> <i>ura3::pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1-URA3</i> <i>trp1::pSPC42-SPC42-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W12245	<i>MATa ura3::pTEF2-GFP-MYC3-CDC20-tCYC1-URA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W12246	<i>MATa HTA2-yEmRFP-HIS3MX6</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HTB1-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12247	<i>MATa HTA2-yEmRFP-HIS3MX6</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HHO1-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12364	<i>MATa trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HTB1-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12365	<i>MATa trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HHO1-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit

MATERIAL

W12366	<i>MATα MPS1-MYC13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W12368	<i>MATα CDC23-GFP-HIS3MX6</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W12369	<i>MATα MAD1-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2 bub3-Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W12370	<i>MATα MAD1-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2 mad3-Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W12371	<i>MATα MAD2-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2 bub3-Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W12372	<i>MATα MAD2-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2 mad3-Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W12374	<i>MATα MAD2-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-CDC5-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W12376	<i>MATα MAD2-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-cdc5K110M-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W12377	<i>MATα MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2- CDC5-MYC9-LEU2</i> <i>his3::pGAL1-FLAG3-MPS1-tCYC1-HIS3</i>	W303	diese Arbeit
W12378	<i>MATα MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-CDC5-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W12379	<i>MATα MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-cdc5K110M-MYC9-LEU2</i> <i>his3::pGAL1-FLAG3-MPS1-tCYC1-HIS3</i>	W303	diese Arbeit
W12380	<i>MATα MAD1-GFP-CaURA3 NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1 leu2::pTEF2-cdc5K110M-MYC9-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W12386	<i>MATα SLK19-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-TRP1</i>	W303	diese Arbeit
W12387	<i>MATα MAD3-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2</i>	S288C	diese Arbeit
W12388	<i>MATα BUB3-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2</i>	S288C	diese Arbeit
W12389	<i>MATα MAD3-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2 mad1-Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W12390	<i>MATα MAD3-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2 mad2-Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit

MATERIAL

W12391	<i>MATα BUB3-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2 mad1-Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W12392	<i>MATα BUB3-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2 mad2-Δ::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W12406	<i>MATα trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pTEF2-GFP-HTB1-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12407	<i>MATα trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pTEF2-GFP-HHO1-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12494	<i>MATα CDC5-GFP-CaURA3</i> <i>NDC80-3mCherry-tCYC1-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W12608	<i>MATα bar1-Δ::kanMX4</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-NLS-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12609	<i>MATα bar1-Δ::kanMX4 ura3::pGAL1-MYC3-</i> <i>cdc5N80db1/2-GFP-NLS-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12632	<i>MATα trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-NLS-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12633	<i>MATα trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1 ura3::</i> <i>pGAL1-MYC3-cdc5N80db1/2-GFP-NLS-tCYC1-URA3</i>	W303	diese Arbeit
W12750	<i>MATα trp1::pTEF2-mCherry-NLS-tCYC1-TRP1</i> <i>ura3::pGAL1-MYC3-GFP-NLS-tCYC1-URA3</i>	W303	Sammlung

7.2 Plasmide und Vektoren

Tabelle 7.2 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Vektoren

(Sammlung: Plasmidsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Seufert)

Plasmid	Vektor	Beschreibung	Quelle
	pBlueskript II (pBS) KS+	<i>E.coli</i> Klonierungsvektor (Alting-Mees und Short, 1989)	Sammlung
	pIS375	<i>met15</i> (Sadowski <i>et al.</i> , 2007)	Sammlung
	pRS304	<i>TRP1</i> (Sikorski und Hieter, 1989)	Sammlung
	pRS306	<i>URA3</i> (Sikorski und Hieter, 1989)	Sammlung
	YIPLac128	<i>LEU2</i> (Gietz und Sugino, 1988)	Sammlung
	YIPLac211	<i>URA3</i> (Gietz und Sugino, 1988)	Sammlung
	pFA6a	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)	Sammlung
pAG25	pFA6a	<i>natMX4</i> (Goldstein und McCusker, 1999)	Sammlung

MATERIAL

pKT209	pFA6a-link	<i>CaURA3</i> (Sheff und Thorn, 2004)	Sammlung
pWS378	YIPLac211	<i>cdc5(AS 360-705)-MYC9</i>	Sammlung
pWS540	pBS KS+	<i>CDC5</i>	Sammlung
pWS1105	pRS306	<i>pGALL-SWI5(AS 569-709)S646A/S664A-MYC13</i>	Sammlung
pWS2144	YIPLac128	<i>pCDC5-CDC5-MYC9</i>	Sammlung
pWS2714	YIPLac211	<i>cdc5pm5(AS 360-705, S657A)-MYC9</i>	diese Arbeit
pWS2715	YIPLac128	<i>pCDC5-cdc5pm4(S419A)-MYC9</i>	diese Arbeit
pWS2716	YIPLac128	<i>pCDC5-cdc5pm1/2(T23A/T70A)-MYC9</i>	diese Arbeit
pWS2717	YIPLac128	<i>pCDC5-cdc5pm5-MYC9</i>	diese Arbeit
pWS2718	YIPLac128	<i>pCDC5-cdc5pm1/2/4/5-MYC9</i>	diese Arbeit
pWS2719	YIPLac128	<i>pCDC5-cdc5pm4/5-MYC9</i>	diese Arbeit
pWS2741	pRS306	<i>pGAL1-MYC3-GFP-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS2768	pRS306	<i>pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS2769	pRS306	<i>pGAL1-MYC3-cdc5N80pm1/2-GFP-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS2821	pIS375	<i>pCDC5-CDC5-MYC9</i>	diese Arbeit
pWS2826	pIS375	<i>pCDC5-cdc5pm1/2-MYC9</i>	diese Arbeit
pWS2914	pBS KS+	<i>cdc5pm2D</i>	diese Arbeit
pWS2915	pBS KS+	<i>cdc5pm1/2D</i>	diese Arbeit
pWS2916	pBS KS+	<i>cdc5pm2E</i>	diese Arbeit
pWS2917	pBS KS+	<i>cdc5pm1/2E</i>	diese Arbeit
pWS2944	YIPLac128	<i>pCDC5-cdc5pm1/2D-MYC9</i>	diese Arbeit
pWS2946	YIPLac128	<i>pCDC5-cdc5pm1/2E-MYC9</i>	diese Arbeit
pWS2974	pRS306	<i>pGAL1-FLAG3-CDC5-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS2975	pRS306	<i>pGAL1-FLAG3-cdc5K110M-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS2976	pIS375	<i>pCDC5-cdc5pm1/2D-MYC9</i>	diese Arbeit
pWS3493	pBS KS+	<i>cdc5(AS 520-705)-GFP-tADH1</i>	diese Arbeit
pWS3497	YIPLac128	<i>pCDC5-CDC5-GFP-tADH1</i>	diese Arbeit
pWS3498	YIPLac128	<i>pCDC5-cdc5pm1/2-GFP-tADH1</i>	diese Arbeit
pWS3499	YIPLac128	<i>pCDC5-cdc5pm1/2D-GFP-tADH1</i>	diese Arbeit
pWS3501	pRS306	<i>pGAL1-FLAG3-cdc5ΔN72-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS3527	pRS306	<i>pGAL1-FLAG3-cdc5pm1/2-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS3528	pRS306	<i>pGAL1-FLAG3-cdc5pm1/2D-tCYC1</i>	diese Arbeit

MATERIAL

pWS3574	pRS304	<i>nop56(C-term.)-3mCherry-tCYC1</i>	Sammlung
pWS3597	pBS KS+	<i>NES (NMD3; AS 441-518)</i>	diese Arbeit
pWS3600	pRS306	<i>pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-NES-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS3617	pBS KS+	<i>pHMO1-HMO1</i>	Sammlung
pWS3660	pBS KS+	<i>HMO1</i>	diese Arbeit
pWS3673	pRS306	<i>pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HMO1-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS3775	pRS306	<i>pTEF2-GFP- NLS (SWI5; AS 614-663, S646A)-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS3790	pRS306	<i>pGAL1-MYC3-GFP-NLS -tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS3805	pRS306	<i>pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HTB1-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS3807	pRS306	<i>pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-HHO1-tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS3926	pRS306	<i>pGAL1-MYC3-cdc5N80-GFP-NLS -tCYC1</i>	diese Arbeit
pWS3927	pRS306	<i>pGAL1-MYC3-cdc5N80db1/2-GFP-NLS -tCYC1</i>	diese Arbeit

7.3 Oligonukleotide

Tabelle 7.3 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidsequenzen

Oligo	Sequenz (5' – 3') und Verwendung
WS84	TTCCAGTCACGACGTTG <i>forward</i> -Primer zur Sequenzierung von pBS-Derivaten
WS85	CACACAGGAAACAGCTATG <i>reverse</i> -Primer zur Sequenzierung von pBS-Derivaten
WS358	GTAAATTGGTGACCTACATTGCGCCCTCCCATGAAAGCAC Mutagenese von <i>CDC5</i> , Austausch S687A, Einführung einer CfoI-Schnittstelle
WS359	GTGCTTTCATGGGAGGGCGCAATGTAGGTCACCAATTTAC Mutagenese von <i>CDC5</i> , Austausch S687A, Einführung einer CfoI-Schnittstelle
WS826	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG Primer zur Paarungstypbestimmung (Huxley <i>et al.</i> , 1990)
WS827	GCACGGAATATGGGACTACTTCG Primer zur Paarungstypbestimmung, α -spezifisch (Huxley <i>et al.</i> , 1990)
WS828	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG Primer zur Paarungstypbestimmung, α -spezifisch (Huxley <i>et al.</i> , 1990)

MATERIAL

WS1443	CATTTGAAGTAGATATTTGG <i>CDC5</i> -Sequenzierprimer, bindet bp776-795 der <i>CDC5</i> -Sequenz
WS1728	CCGTTCCAAGTTAGTTCATGAACCAATAAAGGGAAATAC Mutagenese von <i>CDC5</i> , Austausch von T23E, Einfügen einer NlaIII-Schnittstelle
WS1729	GTATTTCCCTTTATTGGTTCATGAACCTTGGGAACG Mutagenese von <i>CDC5</i> , Austausch von T23E, Einfügen einer NlaIII-Schnittstelle
WS1730	AAAGTTATCAGCTTTGTGTAAAGAACCACCTTCATTAATCAAAAC Mutagenese von <i>CDC5</i> , Austausch von T70E
WS1731	GTTTTGATTAATGAAGGTGGTTCCTTACACAAAGCTGATAACTTT Mutagenese von <i>CDC5</i> , Austausch von T70E
WS1732	CCGTTCCAAGTTAGTTCATGACCCAATAAAGGGAAATAC Mutagenese von <i>CDC5</i> , Austausch von T23D, Einfügen einer NlaIII-Schnittstelle
WS1733	GTATTTCCCTTTATTGGGTCATGAACCTTGGGAACG Mutagenese von <i>CDC5</i> , Austausch von T23D, Einfügen einer NlaIII-Schnittstelle
WS1734	AAAGTTATCAGCTTTGTGTAAAGATCCACCTTCATTAATCAAAAC Mutagenese von <i>CDC5</i> , Austausch von T70D, Einfügen einer XhoII-Schnittstelle
WS1735	GTTTTGATTAATGAAGGTGGATCTTTACACAAAGCTGATAACTTT Mutagenese von <i>CDC5</i> , Austausch von T70D, Einfügen einer XhoII-Schnittstelle
WS2134	CTTTGATAAAGGAAGGTTTGAAGCAGAAGTCCACAATTGTTACCGTAGATGGT GACGGTGCTGGTTTA C-terminale GFP-Markierung von <i>CDC5</i> mit pFA6a-link-System
WS2135	CAATGGACTGGTAATTTTCGTATTCGTATTTCTTTCTACTTTAATATTGGTTCGA TGAATTCGAGCTCG C-terminale GFP-Markierung von <i>CDC5</i> mit pFA6a-link-System
WS2155	CCAATGATAGTTACCAAGTGG Amplifikation des C-terminalen Fragments von <i>CDC5</i> (AS 520-705) mit interner Sall-Schnittstelle
WS2156	CCCAAGCTTTGCCGGTAGAGGTGTGGT Amplifikation des pFA6a-link-Fragments im <i>tADH1</i> mit HindIII-Schnittstelle
WS2196	CATTCTCTACCAACGATCATAAAGTTGGTGCGCAGGTCAGCTATAAATATGGT GACGGTGCTGGTTTA C-terminale GFP-Markierung von <i>MAD2</i> mit pFA6a-link-System
WS2197	GAGATTTTTTTGGACTTCCGTCTTTTTTTTTTTTTTTGACTTGAATTCTA TCGATGAATTCGAGCTCG C-terminale GFP-Markierung von <i>MAD2</i> mit pFA6a-link-System

MATERIAL

WS2198	GCTTTTGGCAACAATAACATTGCGTCTGTGGGAACAGCGACAAGCCAAAGG TGACGGTGCTGGTTTA C-terminale GFP-Markierung von <i>MAD1</i> mit pFA6a-link-System
WS2199	TATCATATTATAAAACCGATTACTATTATCTATTAGAAATGTATATACACTCG ATGAATTCGAGCTCG C-terminale GFP-Markierung von <i>MAD1</i> mit pFA6a-link-System
WS2224	CGGAATTCAGATCTCGTGCAGAAAAGGACTACG Amplifikation der NES-Sequenz aus <i>NMD3</i> (AS 441-518) mit EcoRI- und BglII-Schnittstelle
WS2225	CCGCTCGAGGCTTGCCTATCTAGTTTTCAAC Amplifikation der NES-Sequenz aus <i>NMD3</i> (AS 441-518) mit XhoI-Schnittstelle
WS2259	CAGATGATGACAAGTCGAGTTCGTCTTTCATATCGTACCCACCACAGCGTGGT GACGGTGCTGGTTTA C-terminale GFP-Markierung von <i>MAD3</i> mit pFA6a-link-System
WS2260	GTGTTTACGATTGGCCAGTATACTTACTCATTCATGGGATTAGTTTTATTTCGA TGAATTCGAGCTCG C-terminale GFP-Markierung von <i>MAD3</i> mit pFA6a-link-System
WS2261	CTATTGAACTAAACGCAAGTTCAATATACATAATATTTGACTATGAGAACGGT GACGGTGCTGGTTTA C-terminale GFP-Markierung von <i>BUB3</i> mit pFA6a-link-System
WS2262	ATTTTTTTCTGGAATGTTCTATCATACTACACGAATCTTCACGAAGATATCGA TGAATTCGAGCTCG C-terminale GFP-Markierung von <i>BUB3</i> mit pFA6a-link-System
WS2294	CGGAATTCAGATCTATGACTACAGATCCTTCTGTC Amplifikation von <i>HMO1</i> mit EcoRI- und BglII-Schnittstelle
WS2295	CCGCTCGAGTCAAATAGAAGAGTTGGATTTG Amplifikation von <i>HMO1</i> mit XhoI-Schnittstelle
WS2380	GCGCCAGATCTATGGGTAAGAAATTCAATAGAGAAGAC Amplifikation der NLS-Sequenz aus <i>SWI5</i> (AS 614-663 mit S646A) mit BglII-Schnittstelle
WS2381	GCGCCCTCGAGTTAACTAGAAACACTTGAAGTTCCAT Amplifikation der NLS-Sequenz aus <i>SWI5</i> (AS 614-663 mit S646A) mit XhoI-Schnittstelle
WS2388	AAAGAGAAGAAAAGCAGGAGTTACTCAAGTTGTTAGAAAATGAAAAAAAAG GTGACGGTGCTGGTTTA C-terminale GFP-Markierung von <i>SLK19</i> mit pFA6a-link-System

MATERIAL

WS2389	TCTCATGACATATTAAGGGAAAAGATAAAATGCAAAAGAAAAAATGCGTTC GATGAATTCGAGCTCG C-terminale GFP-Markierung von <i>SLK19</i> mit pFA6a-link-System
WS2392	TCAATGATGTGGTAGACACTGTTTTAAGGAAATTTGCAGATTACAAAATTCGG ATCCCCGGGTAAATTAA C-terminale Epitopmarkierung von <i>MPS1</i> mittels pFA6a-System
WS2393	TGTATTTATGTTTCATAACTGGCACATGCTTTTCTTCCTTATGCGGCTCTTGAAT TCGAGCTCGTTTAAAC C-terminale Epitopmarkierung von <i>MPS1</i> mittels pFA6a-System
WS2394	GCGCCAGATCTATGGCACCCAAGAAATCCACTA Amplifikation von <i>HHO1</i> mit BglII-Schnittstelle
WS2395	GCGCCCTCGAGTTACGTGGAGAGTTTGACCTTC Amplifikation von <i>HHO1</i> mit XhoI-Schnittstelle
WS2396	GCGCCAGATCTATGTCTGCTAAAGCCGAAAAGAA Amplifikation von <i>HTB1</i> mit BglII-Schnittstelle
WS2397	GCGCCCTCGAGTTATGCTTGAGTAGAGGAAGAGT Amplifikation von <i>HTB1</i> mit XhoI-Schnittstelle

7.4 Nukleinsäuren

dNTPs	New England Biolabs, Ipswich (USA)
GeneRuler™ DNA-Längenstandard	Fermentas International Inc., Burlington (Canada)
Heringssperma-DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Oligonukleotide	MWG-Biotech AG, Ebersberg

7.5 Enzyme und Proteine

BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen (Merck), Darmstadt
Lysozym	Fluka, Deisenhofen
Novozym 234	NovoBiolabs, Bagsværd (Dänemark)
Proteinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt
Proteinmarker Color Plus	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim und New England Biolabs, Ipswich (USA)

MATERIAL

RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Taq DNA-Polymerase	Biomaster GmbH, Windeck
α -Faktor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

7.6 Antikörper und Seren

7.6.1 Primäre Antikörper und Seren

9E10	1:100	Monoklonaler Mausantikörper gegen das c-myc-Epitop (Evan <i>et al.</i> , 1985)
12CA5	1:50	Monoklonaler Mausantikörper gegen das ha-Epitop (Field <i>et al.</i> , 1988)
M2 (anti-flag)	1:20000	Monoklonaler Mausantikörper gegen das flag-Epitop (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Anti-Cdc5	1:5000	Polyklonales Kaninchenserum gegen Cdc5 (Matos <i>et al.</i> , 2008)
Anti-Clb2	1:2000 1:5000	Polyklonales Kaninchenserum gegen Clb2 (Amon <i>et al.</i> , 1994)
Anti-Gcd11	1:1000	Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen Gcd11 (Perzlmaier, 2011)
Anti-Tub2	1:5000	Polyklonales Kaninchenserum gegen β -Tubulin (Eurogentec Deutschland GmbH, Köln)

7.6.2 Sekundäre Antikörper

Ziege-Anti-Maus-IRDye [®] 800	1:5000	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Ziege-Anti-Kaninchen-IRDye [®] 800	1:5000	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Ziege-Anti-Kaninchen-IRDye [®] 680	1:5000	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg

7.7 Chemikalien

Aceton p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Acrylamid 30%/ Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Adeninsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose ultra pure	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Aminosäuren	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Pepton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Trypton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bradfordreagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Calciumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
clonNAT (Nourseothricin)	Werner BioAgents, Jena
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-Galaktose	Gerbu Biochemicals GmbH, Gaiberg
D-Glukose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylformamid (DMFA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
D-Raffinose-Pentahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
D-Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
D-Sorbitol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

MATERIAL

Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Euroagar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
5-Fluororotsäure (5-FOA)	HISS Diagnostics GmbH, Freiburg
G418-Sulfat (Kanamycin)	Calbiochem (Merck KGaA), Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β -Glycerolphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe und Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe und Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Deisenhofen und Merck KGaA, Darmstadt
Lithiumacetat	Fluka, Deisenhofen
Magermilchpulver	Humana Milchunion eG Lasana, Everswinkel
Magnesium(II)chlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
myo-Inositol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe und Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Nocodazol	Fluka, Deisenhofen und AppliChem GmbH, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
p-Aminobenzoesäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Polyethylenglykol (PEG) 3350	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

MATERIAL

Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ProteinA-Agarose	Santa Cruz Biotechnologie Inc., Santa Cruz (USA)
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Sytox Green	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tris-Base	USB Corporation, Staufen
Tween 20	Fluka, Deisenhofen und Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Yeast Nitrogen Base	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)

7.8 Sonstige Materialien

Deckgläser 18 x 18 mm	VWR International GmbH, Ismaning
Deckgläser 22 x 22 mm	VWR International GmbH, Ismaning
Deckgläser 24 x 60 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Dialysemembran VS 0,025 µm	Millipore Corporation, Billerica (USA)
Elektroporationsküvetten	Equibio, Maidstone Kent (UK) und Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Falcon Tube (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gasperlen (0,45 - 0,5 mm)	Braun Biotech, Melsungen und Sartorius AG, Göttingen
Glaspipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt und Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Glaswaren	Schott AG, Mainz und Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Immersionsöl 518F	Zeiss, Jena
Impfösen steril 1 µl	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
JETSPIN Plasmid Midiprep Kit	Genomed GmbH, Löhne
Küvetten	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Mikrotiterplatten 96-well	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

MATERIAL

Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
Nucleo Spin® Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig und VWR International GmbH, Ismaning
PCR Gefäße	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Petrischalen 92 x 16 mm (mit Nocken)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym Biotech Trading GmbH, Wien
Pipettenspitzen 100 µl	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000 µl	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Reagiergefäße 1,5 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße 2 ml	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Reagiergefäße mit Schraubdeckel (1,5 ml und 2 ml)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Röhren 3,5 ml, 55 x 12 mm, PS	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel und Nalge Nunc International Corp., Rochester (USA)
Whatman GB005	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel

7.9 Geräte

Autoklav Systec D-65	Systec GmbH, Osnabrück
Brutschrank Tv50b	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Brutschrank WB 120 K	Mytron Bio und Solartechnik GmbH, Heilbad Heiligenstadt
Digitalkamera E-500	Olympus, Hamburg
Durchflusszytometer CA-III und CyFlow Space	Partec, Münster
Elektroblotapparat Semi-Dry SEDEC M	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektroporationsapparat EP 2510	Eppendorf AG, Hamburg
Frogger	DAN-KAN Corp., Massachusetts (USA)

MATERIAL

Gelapparatur für Acrylamidgele, Minigel Twin G42	Biometra, Göttingen
Gelapparatur für Agarosegele, Modell HE33	Hoefer, San Francisco (USA)
Heizblock TCR 100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnetrührer MR2000 und MR2002	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Mehrkanalpipetten Research [®] (variabel) 200 µl, 8-Kanal	Abimed GmbH, Langenfeldt
Mehrkanal-Pipette Research [®] pro (elektronisch) 1200 µl, 8-Kanal	Eppendorf AG, Hamburg
Microliter [™] Spritze	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz (Schweiz)
Mikromanipulator MSM System	MSM System Singer Instruments Co Ltd, Roadwater Somerset (UK)
Mikroskop Imager M1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mikroskop Observer Z.1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mikroskop Olympus CH2	Olympus, Hamburg
Multipette [®] plus	Eppendorf AG, Hamburg
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
pH-Meter 766 Caltimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschman Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Pipetten Labmate [™] L10, L20, L200, L1000	Abimed GmbH, Langenfeldt
Pipetten Research [®] (variabel) 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzglasroller TC-7	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Retsch-Mühle MM200 und MM2000	Kurt Retsch GmbH, Haan
Rotator	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Rotator mit Vortexer	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Schüttelwasserbad	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Schüttelwasserbad Aquatron	Infors AG, Einsbach

MATERIAL

Schüttelinkubator VorTemp56	Labnet International Inc., Berkshire (UK)
Sonopuls Ultraschall-Homogenisator HD2070	Bandelin Electronics GmbH & Co. KG, Berlin
Spannungsgerät EV243	Consort, Turnhout (Belgien)
Spektrophotometer Ultrospec III	LKB Pharmacia, Freiburg
Thermocycler Primus 25	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermocycler peqSTAR 96 Universal Gradient	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
UV Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla (USA)
UV-Tisch TF-20 M	Vilbert Lourmat, Marne-la-Valleé (Frankreich)
Vortex Mixer	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Waage Kern EW6200-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Waage Mettler AE50	Mettler Toledo Intl. Inc., Greifensee (Schweiz)
Wasseraufbereitungsanlage MilliQ	Millipore Corporation Billerica (USA)
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co. KG Labortechnik, Uetze
Wippe Mini Rocker MR1	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Wippschüttler ST 5 CAT	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Zentrifuge 5415 D, 5417 R, 5810	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 3L	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Kühlzentrifuge RC-5b	Sorvall, Bad Homburg

7.10 Software und Datenbanken

Axio Vision LE Rel. 4.8	Carl Zeiss Vision, Göttingen
Bio Edit Sequence Alignment Editor	Tom Hall Ibis Biosciences, Karlsbad (USA)
Clone Manager 6	Scientific & Educational Central, Cary (USA)
ClustalW2	www.ebi.ac.uk/Tools
Corel Draw Graphics Suite 11 und X4	Corel Corporation, Ottawa (Kanada)
FCS Express 4	De Novo Software, Los Angeles (USA)
Image J	Rasband, W.S., U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland (USA)
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond (USA)

MATERIAL

NCBI-Datenbank	www.ncbi.nlm.nih.gov
NLS-Mapper	nls-mapper.iab.keio.ac.jp/
Odyssey Application Software 3.0.21	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
Photoshop CS2	Adobe Systems Incorporated, San José (USA)
Reverse Compliment	www.bioinformatics.org/SMS/rev.comp.html
<i>Saccharomyces</i> Genome Database SGD	www.yeastgenome.org
Windows™ FloMax® Software	Partec, Münster
WinMDI 2.8	Joe Trotter

7.11 Medien, Puffer und Lösungen

7.11.1 Bakterienmedien

LB-Flüssigmedium	Bacto Trypton	10 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
TB-Flüssigmedium	Bacto Trypton	12 g/l
	Bacto Yeast Extract	24 g/l
	Glycerin	4 ml
	Wasser	ad 900 ml
	→ autoklaviert 170 mM KH ₂ PO ₄ , 720 mM K ₂ HPO ₄	100 ml
SOC-Flüssigmedium	Bacto Trypton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Glukose	20 mM

Für die Herstellung von festen Medien wurde zusätzlich 1,7% (w/v) Euroagar zugegeben. Zur Selektion auf Ampicillinresistenz wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin beigelegt.

7.11.2 Hefemedien

Vollmedium flüssig (XY)	Bacto Pepton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	10 g/l
	Tryptophan	0,2 g/l
	Adeninsulfat	0,1 g/l
	KH ₂ PO ₄	10 mM
	→ autoklaviert	
	Zucker	20 g/l
Selektivmedium flüssig (S)	Yeast Nitrogen Base (10 x)	100 ml/l
	Dropout-5 (10 x)	100 ml/l
	Zucker	20 g/l
Selektivmedium ohne Methionin (S-met) → für <i>pMET3</i> -Stämme	Yeast Nitrogen Base (10 x)	100 ml/l
	Dropout-5 (10 x) ohne Methionin	100 ml/l
	Zucker	20 g/l
Selektivmedium ohne Methionin (SD-MET) → für <i>met15</i> -Stämme	Yeast Nitrogen Base (10 x)	100 ml/l
	CSM-7 (10 x)	100 ml/l
	Glukose	20 g/l
	Lysin	50 mg/l
Selektivmedium mit 5-FOA (SD++5-FOA)	Yeast Nitrogen Base (10 x)	100 ml/l
	Dropout++ (10 x)	100 ml/l
	Glukose	20 g/l
	5-FOA (100 mg/ml in DMSO)	1 mg/ml

Es wurden folgende autoklavierte Zucker-Stammlösungen verwendet: Glukose 20%, Galaktose 20% und Raffinose 10%. Für die Herstellung von festen Medien wurden 1,7% (w/v) Bacto Agar zugegeben.

Je nach Auxotrophiemarker der verwendeten Stämme wurde dem Selektivmedium Adenin (50 mg/l), Histidin (50 mg/l), Leucin (100 mg/l), Tryptophan (100 mg/l) oder Uracil (50 mg/l) zugesetzt. Zur Selektion auf Resistenzen von Toxinen wurde G418 in der Konzentration von 500 µg/ml (W303) bzw. 200 µg/ml (S288C) und clonNAT in der Konzentration von 100 µg/ml zugegeben.

Prä-Sporulationsmedium	Bacto Yeast Extract	8 g/l
	Bacto Pepton	3 g/l
	Adeninsulfat	50 mg/l
	Glukose	100 g/l
	→ sterilfiltriert	

MATERIAL

Sporulationsmedium	Bacto Yeast Extract	1 g/l
	Kaliumacetat	10 g/l
	Dropout++ (10 x)	10 ml/l
	Glukose	0,5 g/l
	→ sterilfiltriert	

7.11.3 Puffer und Lösungen

CSM-7 (10 x)	Arginin	0,5 g/l
	Aspartat	0,8 g/l
	Isoleucin	0,5 g/l
	Phenylalanin	0,5 g/l
	Threonin	1,0 g/l
	Tyrosin	0,5 g/l
	Valin	1,4 g/l
	→ sterilfiltriert	
DNA-Auftragspuffer	Tris/HCl, pH 7,8	10 mM
	EDTA	1 mM
	Bromphenolblau	2,5 mg/ml
	Glycerin	300 mg/ml
Dropout-5 (10 x)	Alanin	0,5 g/l
	Arginin	0,5 g/l
	Asparagin	0,5 g/l
	Aspartat	1 g/l
	Cystein	0,5 g/l
	Glutamin	0,5 g/l
	Glutamat	1 g /l
	Glycin	0,5 g/l
	(myo-)Inositol	0,5 g/l
	Isoleucin	0,5 g/l
	Lysin	0,5 g/l
	Methionin	0,5 g/l
	p-Aminobenzoesäure	50 mg/l
	Phenylalanin	0,5 g/l
	Prolin	0,5 g/l
	Serin	1 g/l
	Threonin	1 g/l

MATERIAL

	Tyrosin Valin → über Nacht gelöst, dann sterilfiltriert	0,5 g/l 1 g/l
Dropout++ (10 x)	Dropout-5 (10 x) Adenin Histidin Leucin Tryptophan Uracil	0,5 g/l 0,5 g/l 1 g/l 1 g/l 0,5 g/l
EasyPrep-Puffer	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA Saccharose Lysozym RNase A BSA → bei -20°C aufbewahrt	10 mM 1 mM 15% (w/v) 2 mg/ml 0,2 mg/ml 0,1 mg/ml
LSB (Lämmli Auftragspuffer, 2 x)	Tris/HCl, pH 6,8 SDS Glycerin Bromphenolblau β-Mercaptoethanol	120 mM 40 mg/ml 200 mg/ml 400 µg/ml 10%
Novozym-Lösung	Sorbitol Tris/HCl, pH 7,5 EDTA DTT Novozym	1 M 10 mM 1 mM 50 mM 2 mg/ml
Ponceau S	Ponceau S Eisessig Wasser	1 g 50 ml ad 1 l
Proteinase K	Proteinase K Tris/HCl, pH 7,5 Calciumacetat	10 mg/ml 10 mM 1 mM
Puffer 3	NaCl Tris/HCl, pH 7,5 NaF EDTA	150 mM 50 mM 50 mM 5 mM

MATERIAL

	Igepal CA-630	0,1%
	β-Glycerolphosphat	60 mM
RNase A	RNase A	10 mg/ml
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	NaCl	15 mM
	→ 15 min gekocht, langsam abgekühlt	
SDS-PAGE	Angaben aus Molecular Cloning - A Laboratory Manual (Maniatis <i>et al.</i> , 1989)	
Sammelgel (1 Stück)	Wasser	1,5 ml
	0,5 M Tris/Cl pH 6.8	625 µl
	Acrylamid-Mix	335 µl
	10% SDS	25 µl
	10% APS	25 µl
	TEMED	2,5 µl
Trenngel 9% (1 Stück)	Wasser	2,6 ml
	1,5 M Tris/Cl pH 8.8	1,5 ml
	Acrylamid-Mix	1,8 ml
	10% SDS	60 µl
	10% APS	36,5 µl
	TEMED	3,65 µl
Trenngel 7% (1 Stück)	Wasser	3,58 ml
	1,5 M Tris/Cl pH 8.8	1,75 ml
	Acrylamid-Mix	1,6 ml
	10% SDS	70 µl
	10% APS	40 µl
	TEMED	5 µl
TAE (50 x)	Tris-Base	2 M
	EDTA	50 mM
	→ pH 8,0 mit Eisessig eingestellt	
TBS (10 x)	Tris-Base	200 mM
	NaCl	1,37 M
	→ pH 7,6 mit HCl eingestellt	
TBS-T	TBS (10 x)	100 ml/l
	Tween 20 (10%)	10 ml/l
TE (10 x)	Tris/HCl, pH 7,5	100 mM
	EDTA	10 mM

MATERIAL

Transferpuffer	Glycin	2,9 g/l
	Tris-Base	5,8 g/l
	SDS (10%)	3,7 ml/l
	Methanol	100 ml/l
Turbo-LRB (Lämmli Laufpuffer, 10 x)	Tris-Base	250 mM
	Glycin	9,46 M
	SDS	10 g/l
YNB (10 x)	Yeast Nitrogen Base	17 g/l
	Ammoniumsulfat	50 g/l

8 Literaturverzeichnis

- Alberghina, L., R.L. Rossi, L. Querin, V. Wanke und M. Vanoni.** 2004. A cell sizer network involving Cln3 and Far1 controls entrance into S phase in the mitotic cycle of budding yeast. *J Cell Biol.* 167:433-43.
- Alexandru, G., F. Uhlmann, K. Mechtler, M.A. Poupart und K. Nasmyth.** 2001. Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell.* 105:459-72.
- Altting-Mees, M.A. und J.M. Short.** 1989. pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* 17:9494.
- Amon, A., S. Irniger und K. Nasmyth.** 1994. Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell.* 77:1037-50.
- Archambault, V. und D.M. Glover.** 2009. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:265-75.
- Arnaud, L., J. Pines und E.A. Nigg.** 1998. GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes. *Chromosoma.* 107:424-9.
- Arnold, L.** 2008. Regulation der Polo-Kinase Cdc5 im Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit.* Universität Regensburg.
- Azzam, R., S.L. Chen, W. Shou, A.S. Mah, G. Alexandru, K. Nasmyth, R.S. Annan, S.A. Carr und R.J. Deshaies.** 2004. Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. *Science.* 305:516-9.
- Bartholomew, C.R., S.H. Woo, Y.S. Chung, C. Jones und C.F. Hardy.** 2001. Cdc5 interacts with the Wee1 kinase in budding yeast. *Mol Cell Biol.* 21:4949-59.
- Bembenek, J., J. Kang, C. Kurischko, B. Li, J.R. Raab, K.D. Belanger, F.C. Luca und H. Yu.** 2005. Crm1-mediated nuclear export of Cdc14 is required for the completion of cytokinesis in budding yeast. *Cell Cycle.* 4:961-71.
- Benanti, J.A., M.E. Matyskiela, D.O. Morgan und D.P. Toczyski.** 2009. Functionally distinct isoforms of Cik1 are differentially regulated by APC/C-mediated proteolysis. *Mol Cell.* 33:581-90.
- Berghammer, H. und B. Auer.** 1993. "Easypreps": fast and easy plasmid miniprep for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques.* 14:524, 528.
- Bertazzi, D.T., B. Kurtulmus und G. Pereira.** 2011. The cortical protein Lte1 promotes mitotic exit by inhibiting the spindle position checkpoint kinase Kin4. *J Cell Biol.* 193:1033-48.
- Bittner, S.** 2011. Die Polo-Kinase Cdc5 im Spindelkontrollsystem. *Bachelorarbeit.* Universität Regensburg.
- Bloom, J., I.M. Cristea, A.L. Procko, V. Lubkov, B.T. Chait, M. Snyder und F.R. Cross.** 2011. Global analysis of Cdc14 phosphatase reveals diverse roles in mitotic processes. *J Biol Chem.* 286:5434-45.
- Booher, R.N., R.J. Deshaies und M.W. Kirschner.** 1993. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *Embo J.* 12:3417-26.
- Bosl, W.J. und R. Li.** 2005. Mitotic-exit control as an evolved complex system. *Cell.* 121:325-33.
- Brachmann, C.B., A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter und J.D. Boeke.** 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast.* 14:115-32.
- Burton, J.L. und M.J. Solomon.** 2000. Hsl1p, a Swe1p inhibitor, is degraded via the anaphase-promoting complex. *Mol Cell Biol.* 20:4614-25.
- Burton, J.L. und M.J. Solomon.** 2001. D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes Dev.* 15:2381-95.
- Burton, J.L. und M.J. Solomon.** 2007. Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APCCdc20 in the spindle assembly checkpoint. *Genes Dev.* 21:655-67.

- Burton, J.L., V. Tsakraklides und M.J. Solomon. 2005. Assembly of an APC-Cdh1-substrate complex is stimulated by engagement of a destruction box. *Mol Cell*. 18:533-42.
- Burton, J.L., Y. Xiong und M.J. Solomon. 2011. Mechanisms of pseudosubstrate inhibition of the anaphase promoting complex by Acm1. *EMBO J*. 30:1818-29.
- Buschhorn, B.A., G. Petzold, M. Galova, P. Dube, C. Kraft, F. Herzog, H. Stark und J.M. Peters. 2011. Substrate binding on the APC/C occurs between the coactivator Cdh1 and the processivity factor Doc1. *Nat Struct Mol Biol*. 18:6-13.
- Calabria, I., B. Baro, J.A. Rodriguez-Rodriguez, N. Russinol und E. Queralt. 2012. Zds1 regulates PP2A(Cdc55) activity and Cdc14 activation during mitotic exit through its Zds_C motif. *J Cell Sci*. 125:2875-84.
- Carmo-Fonseca, M., L. Mendes-Soares und I. Campos. 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol*. 2:E107-12.
- Castillo, A.R., J.B. Meehl, G. Morgan, A. Schutz-Geschwender und M. Winey. 2002. The yeast protein kinase Mps1p is required for assembly of the integral spindle pole body component Spc42p. *J Cell Biol*. 156:453-65.
- Caydasi, A.K. und G. Pereira. 2012. SPOC alert--when chromosomes get the wrong direction. *Exp Cell Res*. 318:1421-7.
- Chao, W.C., K. Kulkarni, Z. Zhang, E.H. Kong und D. Barford. 2012. Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature*. 484:208-13.
- Charles, J.F., S.L. Jaspersen, R.L. Tinker-Kulberg, L. Hwang, A. Szidon und D.O. Morgan. 1998. The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. *Curr Biol*. 8:497-507.
- Cheng, L., L. Hunke und C.F. Hardy. 1998. Cell cycle regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* polo-like kinase cdc5p. *Mol Cell Biol*. 18:7360-70.
- Chi, Y.H., K. Haller, M.D. Ward, O.J. Semmes, Y. Li und K.T. Jeang. 2008. Requirements for protein phosphorylation and the kinase activity of polo-like kinase 1 (Plk1) for the kinetochore function of mitotic arrest deficiency protein 1 (Mad1). *J Biol Chem*. 283:35834-44.
- Cho, U.S., K.D. Corbett, J. Al-Bassam, J.J. Bellizzi, 3rd, P. De Wulf, C.W. Espelin, J.J. Miranda, K. Simons, R.R. Wei, P.K. Sorger und S.C. Harrison. 2010. Molecular structures and interactions in the yeast kinetochore. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 75:395-401.
- Cohen-Fix, O. und D. Koshland. 1999. Pds1p of budding yeast has dual roles: inhibition of anaphase initiation and regulation of mitotic exit. *Genes Dev*. 13:1950-9.
- Cohen-Fix, O., J.M. Peters, M.W. Kirschner und D. Koshland. 1996. Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev*. 10:3081-93.
- Cooper, K.F., M.J. Mallory, D.B. Egeland, M. Jarnik und R. Strich. 2000. Ama1p is a meiosis-specific regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:14548-53.
- Cryer, D.R., R. Eccleshall und J. Marmur. 1975. Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol*. 12:39-44.
- D'Amours, D., F. Stegmeier und A. Amon. 2004. Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell*. 117:455-69.
- D'Aquino, K.E., F. Monje-Casas, J. Paulson, V. Reiser, G.M. Charles, L. Lai, K.M. Shokat und A. Amon. 2005. The protein kinase Kin4 inhibits exit from mitosis in response to spindle position defects. *Mol Cell*. 19:223-34.
- da Fonseca, P.C., E.H. Kong, Z. Zhang, A. Schreiber, M.A. Williams, E.P. Morris und D. Barford. 2011. Structures of APC/C(Cdh1) with substrates identify Cdh1 and Apc10 as the D-box co-receptor. *Nature*. 470:274-8.
- Daniel, J.A., B.E. Keyes, Y.P. Ng, C.O. Freeman und D.J. Burke. 2006. Diverse functions of spindle assembly checkpoint genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 172:53-65.
- Darieva, Z., R. Bulmer, A. Pic-Taylor, K.S. Doris, M. Geymonat, S.G. Sedgwick, B.A. Morgan und A.D. Sharrocks. 2006. Polo kinase controls cell-cycle-dependent transcription by targeting a coactivator protein. *Nature*. 444:494-8.
- De Antoni, A., C.G. Pearson, D. Cimini, J.C. Canman, V. Sala, L. Nezi, M. Mapelli, L. Sironi, M. Faretta, E.D. Salmon und A. Musacchio. 2005. The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol*. 15:214-25.

- De Wulf, P., F. Montani und R. Visintin.** 2009. Protein phosphatases take the mitotic stage. *Curr Opin Cell Biol.* 21:806-15.
- Deshaies, R.J. und C.A. Joazeiro.** 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem.* 78:399-434.
- Dolinski, K. und D. Botstein.** 2007. Orthology and functional conservation in eukaryotes. *Annu Rev Genet.* 41:465-507.
- Dower, W.J., J.F. Miller und C.W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16:6127-45.
- Elia, A.E., L.C. Cantley und M.B. Yaffe.** 2003a. Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science.* 299:1228-31.
- Elia, A.E., P. Rellos, L.F. Haire, J.W. Chao, F.J. Ivins, K. Hoepker, D. Mohammad, L.C. Cantley, S.J. Smerdon und M.B. Yaffe.** 2003b. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell.* 115:83-95.
- Enquist-Newman, M., M. Sullivan und D.O. Morgan.** 2008. Modulation of the mitotic regulatory network by APC-dependent destruction of the Cdh1 inhibitor Acm1. *Mol Cell.* 30:437-46.
- Enserink, J.M. und R.D. Kolodner.** 2010. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div.* 5:11.
- Epstein, C.B. und F.R. Cross.** 1992. CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev.* 6:1695-706.
- Evan, G.I., G.K. Lewis, G. Ramsay und J.M. Bishop.** 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol.* 5:3610-6.
- Falk, J.E., L.Y. Chan und A. Amon.** 2011. Lte1 promotes mitotic exit by controlling the localization of the spindle position checkpoint kinase Kin4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:12584-90.
- Feldman, R.M., C.C. Correll, K.B. Kaplan und R.J. Deshaies.** 1997. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell.* 91:221-30.
- Field, J., J. Nikawa, D. Broek, B. MacDonald, L. Rodgers, I.A. Wilson, R.A. Lerner und M. Wigler.** 1988. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol.* 8:2159-65.
- Finley, D., H.D. Ulrich, T. Sommer und P. Kaiser.** 2012. The Ubiquitin-Proteasome System of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 192:319-60.
- Foster, S.A. und D.O. Morgan.** 2012. The APC/C Subunit Mnd2/Apc15 Promotes Cdc20 Autoubiquitination and Spindle Assembly Checkpoint Inactivation. *Mol Cell.* 47:921-32.
- Fraschini, R., A. Beretta, L. Sironi, A. Musacchio, G. Lucchini und S. Piatti.** 2001. Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores. *EMBO J.* 20:6648-59.
- Fujimura, H. und Y. Sakuma.** 1993. Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeasts. *Biotechniques.* 14:538-40.
- Gadal, O., S. Labarre, C. Boschiero und P. Thuriaux.** 2002. Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *EMBO J.* 21:5498-507.
- Gadal, O., D. Strauss, J. Kessl, B. Trumpower, D. Tollervey und E. Hurt.** 2001. Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol.* 21:3405-15.
- Gartner, A., A. Jovanovic, D.I. Jeoung, S. Bourlat, F.R. Cross und G. Ammerer.** 1998. Pheromone-dependent G1 cell cycle arrest requires Far1 phosphorylation, but may not involve inhibition of Cdc28-Cln2 kinase, in vivo. *Mol Cell Biol.* 18:3681-91.
- Gaub, L.** 2010. Studien zur zellzyklusabhängigen Proteindegradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bachelorarbeit.* Universität Regensburg.
- Gautier, T., T. Berges, D. Tollervey und E. Hurt.** 1997. Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol.* 17:7088-98.
- Geil, C.** 2008. Tof2 - ein nukleolarer Aktivator der Phosphatase Cdc14 unterstützt die rDNA Trennung in *S.cerevisiae*. *Dissertation.* Universität Regensburg.
- Geymonat, M., A. Spanos, G. de Bettignies und S.G. Sedgwick.** 2009. Lte1 contributes to Bfa1 localization rather than stimulating nucleotide exchange by Tem1. *J Cell Biol.* 187:497-511.

- Geymonat, M., A. Spanos, S.J. Smith, E. Wheatley, K. Rittinger, L.H. Johnston und S.G. Sedgwick. 2002. Control of mitotic exit in budding yeast. In vitro regulation of Tem1 GTPase by Bub2 and Bfa1. *J Biol Chem.* 277:28439-45.
- Geymonat, M., A. Spanos, P.A. Walker, L.H. Johnston und S.G. Sedgwick. 2003. In vitro regulation of budding yeast Bfa1/Bub2 GAP activity by Cdc5. *J Biol Chem.* 278:14591-4.
- Gietz, R.D. und A. Sugino. 1988. New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.* 74:527-34.
- Gietz, R.D. und R.A. Woods. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350:87-96.
- Gillett, E.S., C.W. Espelin und P.K. Sorger. 2004. Spindle checkpoint proteins and chromosome-microtubule attachment in budding yeast. *J Cell Biol.* 164:535-46.
- Glotzer, M., A.W. Murray und M.W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature.* 349:132-8.
- Goffeau, A., B.G. Barrell, H. Bussey, R.W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J.D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E.J. Louis, H.W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin und S.G. Oliver. 1996. Life with 6000 genes. *Science.* 274:546, 563-7.
- Goldstein, A.L. und J.H. McCusker. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast.* 15:1541-53.
- Gordon, D.M. und D.M. Roof. 2001. Degradation of the kinesin Kip1p at anaphase onset is mediated by the anaphase-promoting complex and Cdc20p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:12515-20.
- Gruneberg, U., K. Campbell, C. Simpson, J. Grindlay und E. Schiebel. 2000. Nud1p links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis. *Embo J.* 19:6475-88.
- Haase, S.B. und D.J. Lew. 1997. Flow cytometric analysis of DNA content in budding yeast. *Methods Enzymol.* 283:322-32.
- Hardwick, K.G., R.C. Johnston, D.L. Smith und A.W. Murray. 2000. MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J Cell Biol.* 148:871-82.
- Hardwick, K.G., E. Weiss, F.C. Luca, M. Winey und A.W. Murray. 1996. Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science.* 273:953-6.
- Hartwell, L.H. 1978. Cell division from a genetic perspective. *J Cell Biol.* 77:627-37.
- Hartwell, L.H., J. Culotti, J.R. Pringle und B.J. Reid. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science.* 183:46-51.
- Hartwell, L.H. und T.A. Weinert. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 246:629-34.
- Havens, K.A., M.K. Gardner, R.J. Kamieniecki, M.E. Dresser und D.S. Dawson. 2010. Slk19p of Saccharomyces cerevisiae regulates anaphase spindle dynamics through two independent mechanisms. *Genetics.* 186:1247-60.
- He, X., S. Asthana und P.K. Sorger. 2000. Transient sister chromatid separation and elastic deformation of chromosomes during mitosis in budding yeast. *Cell.* 101:763-75.
- He, X., D.R. Rines, C.W. Espelin und P.K. Sorger. 2001. Molecular analysis of kinetochore-microtubule attachment in budding yeast. *Cell.* 106:195-206.
- Hershko, A. und A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67:425-79.
- Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the budding yeast Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol Rev.* 52:536-53.
- Herzog, F., I. Primorac, P. Dube, P. Lenart, B. Sander, K. Mechtler, H. Stark und J.M. Peters. 2009. Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. *Science.* 323:1477-81.
- Hildebrandt, E.R. und M.A. Hoyt. 2001. Cell cycle-dependent degradation of the Saccharomyces cerevisiae spindle motor Cin8p requires APC(Cdh1) and a bipartite destruction sequence. *Mol Biol Cell.* 12:3402-16.
- Holt, L.J., A.N. Krutchinsky und D.O. Morgan. 2008. Positive feedback sharpens the anaphase switch. *Nature.* 454:353-7.
- Howell, A.S. und D.J. Lew. 2012. Morphogenesis and the cell cycle. *Genetics.* 190:51-77.
- Howell, B.J., B. Moree, E.M. Farrar, S. Stewart, G. Fang und E.D. Salmon. 2004. Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr Biol.* 14:953-64.

- Hu, F., Y. Wang, D. Liu, Y. Li, J. Qin und S.J. Elledge.** 2001. Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. *Cell*. 107:655-65.
- Huang, J. und D. Moazed.** 2003. Association of the RENT complex with nontranscribed and coding regions of rDNA and a regional requirement for the replication fork block protein Fob1 in rDNA silencing. *Genes Dev.* 17:2162-76.
- Huxley, C., E.D. Green und I. Dunham.** 1990. Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet.* 6:236.
- Hwang, L.H., L.F. Lau, D.L. Smith, C.A. Mistrot, K.G. Hardwick, E.S. Hwang, A. Amon und A.W. Murray.** 1998. Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science*. 279:1041-4.
- Iouk, T., O. Kerscher, R.J. Scott, M.A. Basrai und R.W. Wozniak.** 2002. The yeast nuclear pore complex functionally interacts with components of the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol.* 159:807-19.
- Izawa, D. und J. Pines.** 2012. Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation. *J Cell Biol.* 199:27-37.
- Janke, C., J. Ortiz, J. Lechner, A. Shevchenko, M.M. Magiera, C. Schramm und E. Schiebel.** 2001. The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control. *EMBO J.* 20:777-91.
- Jaquenoud, M., F. van Drogen und M. Peter.** 2002. Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/C(Cdh1). *Embo J.* 21:6515-26.
- Jaspersen, S.L., J.F. Charles und D.O. Morgan.** 1999. Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol.* 9:227-36.
- Jaspersen, S.L., J.F. Charles, R.L. Tinker-Kulberg und D.O. Morgan.** 1998. A late mitotic regulatory network controlling cyclin destruction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 9:2803-17.
- Jaspersen, S.L. und D.O. Morgan.** 2000. Cdc14 activates cdc15 to promote mitotic exit in budding yeast. *Curr Biol.* 10:615-8.
- Jin, Q.W., J. Fuchs und J. Loidl.** 2000. Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization. *J Cell Sci.* 113 (Pt 11):1903-12.
- Juang, Y.L., J. Huang, J.M. Peters, M.E. McLaughlin, C.Y. Tai und D. Pellman.** 1997. APC-mediated proteolysis of Ase1 and the morphogenesis of the mitotic spindle. *Science*. 275:1311-4.
- Kamura, T., D.M. Koepp, M.N. Conrad, D. Skowyra, R.J. Moreland, O. Iliopoulos, W.S. Lane, W.G. Kaelin, Jr., S.J. Elledge, R.C. Conaway, J.W. Harper und J.W. Conaway.** 1999. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science*. 284:657-61.
- Kemmler, S., M. Stach, M. Knapp, J. Ortiz, J. Pfannstiel, T. Ruppert und J. Lechner.** 2009. Mimicking Ndc80 phosphorylation triggers spindle assembly checkpoint signalling. *EMBO J.* 28:1099-110.
- Kerscher, O., L.B. Crotti und M.A. Basrai.** 2003. Recognizing chromosomes in trouble: association of the spindle checkpoint protein Bub3p with altered kinetochores and a unique defective centromere. *Mol Cell Biol.* 23:6406-18.
- Kim, J., G. Luo, Y.Y. Bahk und K. Song.** 2012. Cdc5-dependent asymmetric localization of bfa1 fine-tunes timely mitotic exit. *PLoS Genet.* 8:e1002450.
- Kim, S. und H. Yu.** 2011. Mutual regulation between the spindle checkpoint and APC/C. *Semin Cell Dev Biol.* 22:551-8.
- King, E.M., S.J. van der Sar und K.G. Hardwick.** 2007. Mad3 KEN boxes mediate both Cdc20 and Mad3 turnover, and are critical for the spindle checkpoint. *PLoS One.* 2:e342.
- Kitada, K., A.L. Johnson, L.H. Johnston und A. Sugino.** 1993. A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene *dbf4* encodes a protein kinase and is identified as CDC5. *Mol Cell Biol.* 13:4445-57.
- Kitamura, E., K. Tanaka, S. Komoto, Y. Kitamura, C. Antony und T.U. Tanaka.** 2010. Kinetochore generate microtubules with distal plus ends: their roles and limited lifetime in mitosis. *Dev Cell.* 18:248-59.

- Ko, N., R. Nishihama, G.H. Tully, D. Ostapenko, M.J. Solomon, D.O. Morgan und J.R. Pringle. 2007. Identification of yeast IQGAP (Iqg1p) as an anaphase-promoting-complex substrate and its role in actomyosin-ring-independent cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 18:5139-53.
- König, C., H. Maekawa und E. Schiebel. 2010. Mutual regulation of cyclin-dependent kinase and the mitotic exit network. *J Cell Biol*. 188:351-68.
- Kops, G.J. und J.V. Shah. 2012. Connecting up and clearing out: how kinetochore attachment silences the spindle assembly checkpoint. *Chromosoma*. 121:509-25.
- Kraft, C., H.C. Vodermaier, S. Maurer-Stroh, F. Eisenhaber und J.M. Peters. 2005. The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates. *Mol Cell*. 18:543-53.
- Lämmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- Lanker, S., M.H. Valdivieso und C. Wittenberg. 1996. Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science*. 271:1597-601.
- Lara-Gonzalez, P., M.I. Scott, M. Diez, O. Sen und S.S. Taylor. 2011. BubR1 blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner. *J Cell Sci*. 124:4332-45.
- Lau, D.T. und A.W. Murray. 2012. Mad2 and Mad3 cooperate to arrest budding yeast in mitosis. *Curr Biol*. 22:180-90.
- Lee, K.S., S. Asano, J.E. Park, K. Sakchaisri und R.L. Erikson. 2005a. Monitoring the cell cycle by multi-kinase-dependent regulation of Swe1/Wee1 in budding yeast. *Cell Cycle*. 4:1346-9.
- Lee, K.S. und R.L. Erikson. 1997. Plk is a functional homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5, and elevated Plk activity induces multiple septation structures. *Mol Cell Biol*. 17:3408-17.
- Lee, K.S., T.Z. Grenfell, F.R. Yarm und R.L. Erikson. 1998. Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:9301-6.
- Lee, K.S., J.E. Park, S. Asano und C.J. Park. 2005b. Yeast polo-like kinases: functionally conserved multitask mitotic regulators. *Oncogene*. 24:217-29.
- Lee, S.E., L.M. Frenz, N.J. Wells, A.L. Johnson und L.H. Johnston. 2001. Order of function of the budding-yeast mitotic exit-network proteins Tem1, Cdc15, Mob1, Dbf2, and Cdc5. *Curr Biol*. 11:784-8.
- Lesage, B., J. Qian und M. Bollen. 2011. Spindle checkpoint silencing: PP1 tips the balance. *Curr Biol*. 21:R898-903.
- Lew, D.J. 2003. The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Curr Opin Cell Biol*. 15:648-53.
- Lew, D.J. und S.I. Reed. 1993. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol*. 120:1305-20.
- Liang, F., F. Jin, H. Liu und Y. Wang. 2009. The molecular function of the yeast polo-like kinase Cdc5 in Cdc14 release during early anaphase. *Mol Biol Cell*. 20:3671-9.
- Liang, H., H.H. Lim, A. Venkitaraman und U. Surana. 2011. Cdk1 promotes kinetochore bi-orientation and regulates Cdc20 expression during recovery from spindle checkpoint arrest. *EMBO J*. 31:403-16.
- Lindon, C. und J. Pines. 2004. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J Cell Biol*. 164:233-41.
- Liu, D., O. Davydenko und M.A. Lampson. 2012a. Polo-like kinase-1 regulates kinetochore-microtubule dynamics and spindle checkpoint silencing. *J Cell Biol*. 198:491-9.
- Liu, X. und M. Winey. 2012. The MPS1 family of protein kinases. *Annu Rev Biochem*. 81:561-85.
- Liu, X.S., B. Song, J. Tang, W. Liu, S. Kuang und X. Liu. 2012b. Plk1 phosphorylates Sgt1 at the kinetochores to promote timely kinetochore-microtubule attachment. *Mol Cell Biol*. 32:4053-67.
- Llamazares, S., A. Moreira, A. Tavares, C. Girdham, B.A. Spruce, C. Gonzalez, R.E. Karess, D.M. Glover und C.E. Sunkel. 1991. polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev*. 5:2153-65.
- London, N., S. Ceto, J.A. Ranish und S. Biggins. 2012. Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores. *Curr Biol*. 22:900-6.

- Longtine, M.S., A. McKenzie, 3rd, D.J. Demarini, N.G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen und J.R. Pringle.** 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14:953-61.
- Lowery, D.M., D. Lim und M.B. Yaffe.** 2005. Structure and function of Polo-like kinases. *Oncogene*. 24:248-59.
- Luo, X., G. Fang, M. Coldiron, Y. Lin, H. Yu, M.W. Kirschner und G. Wagner.** 2000. Structure of the Mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with Cdc20. *Nat Struct Biol*. 7:224-9.
- Luo, X., Z. Tang, J. Rizo und H. Yu.** 2002. The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Mol Cell*. 9:59-71.
- Maekawa, H., C. Priest, J. Lechner, G. Pereira und E. Schiebel.** 2007. The yeast centrosome translates the positional information of the anaphase spindle into a cell cycle signal. *J Cell Biol*. 179:423-36.
- Mah, A.S., J. Jang und R.J. Deshaies.** 2001. Protein kinase Cdc15 activates the Dbf2-Mob1 kinase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:7325-30.
- Maniatis, T., J. Sambrook und E.F. Fritsch.** 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Manzoni, R., F. Montani, C. Visintin, F. Caudron, A. Ciliberto und R. Visintin.** 2010. Oscillations in Cdc14 release and sequestration reveal a circuit underlying mitotic exit. *J Cell Biol*. 190:209-22.
- Mariani, L., E. Chirolì, L. Nezi, H. Muller, S. Piatti, A. Musacchio und A. Ciliberto.** 2012. Role of the Mad2 Dimerization Interface in the Spindle Assembly Checkpoint Independent of Kinetochores. *Curr Biol*.
- Martinez, J.S., D.E. Jeong, E. Choi, B.M. Billings und M.C. Hall.** 2006. Acml1 is a negative regulator of the CDH1-dependent anaphase-promoting complex/cyclosome in budding yeast. *Mol Cell Biol*. 26:9162-76.
- Matos, J., J.J. Lipp, A. Bogdanova, S. Guillot, E. Okaz, M. Junqueira, A. Shevchenko und W. Zachariae.** 2008. Dbf4-dependent CDC7 kinase links DNA replication to the segregation of homologous chromosomes in meiosis I. *Cell*. 135:662-78.
- Matyskiela, M.E., M.C. Rodrigo-Brenni und D.O. Morgan.** 2009. Mechanisms of ubiquitin transfer by the anaphase-promoting complex. *J Biol*. 8:92.
- Meitinger, F., S. Palani und G. Pereira.** 2012. The power of MEN in cytokinesis. *Cell Cycle*. 11:219-28.
- Melloy, P.G. und S.L. Holloway.** 2004. Changes in the localization of the *Saccharomyces cerevisiae* anaphase-promoting complex upon microtubule depolymerization and spindle checkpoint activation. *Genetics*. 167:1079-94.
- Meluh, P.B., P. Yang, L. Glowczewski, D. Koshland und M.M. Smith.** 1998. Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*. 94:607-13.
- Merz, K., M. Hondele, H. Goetze, K. Gmelch, U. Stoeckl und J. Griesenbeck.** 2008. Actively transcribed rRNA genes in *S. cerevisiae* are organized in a specialized chromatin associated with the high-mobility group protein Hmo1 and are largely devoid of histone molecules. *Genes Dev*. 22:1190-204.
- Michael, S., G. Trave, C. Ramu, C. Chica und T.J. Gibson.** 2008. Discovery of candidate KEN-box motifs using cell cycle keyword enrichment combined with native disorder prediction and motif conservation. *Bioinformatics*. 24:453-7.
- Miller, J. und C. Gordon.** 2005. The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett*. 579:3224-30.
- Miniowitz-Shemtov, S., E. Eytan, D. Ganoh, D. Sitry-Shevah, E. Dumin und A. Hershko.** 2012. Role of phosphorylation of Cdc20 in p31(comet)-stimulated disassembly of the mitotic checkpoint complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:8056-60.
- Mirchenko, L. und F. Uhlmann.** 2010. Slh15(INCENP) dephosphorylation prevents mitotic checkpoint reengagement due to loss of tension at anaphase onset. *Curr Biol*. 20:1396-401.
- Mohl, D.A., M.J. Huddleston, T.S. Collingwood, R.S. Annan und R.J. Deshaies.** 2009. Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitosis. *J Cell Biol*. 184:527-39.

- Moll, T., G. Tebb, U. Surana, H. Robitsch und K. Nasmyth. 1991. The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell*. 66:743-58.
- Monje-Casas, F. und A. Amon. 2009. Cell polarity determinants establish asymmetry in MEN signaling. *Dev Cell*. 16:132-45.
- Morgan, D.O. 2007. The Cell Cycle: Principles of Control. *New Science Press Ltd*, London.
- Mortensen, E.M., W. Haas, M. Gygi, S.P. Gygi und D.R. Kellogg. 2005. Cdc28-dependent regulation of the Cdc5/Polo kinase. *Curr Biol*. 15:2033-7.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51 Pt 1:263-73.
- Musacchio, A. und E.D. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:379-93.
- Nakashima, A., Y. Maruki, Y. Imamura, C. Kondo, T. Kawamata, I. Kawanishi, H. Takata, A. Matsuura, K.S. Lee, U. Kikkawa, Y. Ohsumi, K. Yonezawa und Y. Kamada. 2008. The yeast Tor signaling pathway is involved in G2/M transition via polo-kinase. *PLoS One*. 3:e2223.
- Nash, P., X. Tang, S. Orlicky, Q. Chen, F.B. Gertler, M.D. Mendenhall, F. Sicheri, T. Pawson und M. Tyers. 2001. Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature*. 414:514-21.
- Neutzner, M. 2003. Regulatoren des Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*: die Polo-Kinase Cdc5 und der Ubiquitinierungsfaktor Hct1. *Dissertation*. Universität Stuttgart.
- Obrig, T.G., W.J. Culp, W.L. McKeehan und B. Hardesty. 1971. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem*. 246:174-81.
- Ostapenko, D., J.L. Burton und M.J. Solomon. 2012. Identification of Anaphase Promoting Complex Substrates in *S. cerevisiae*. *PLoS One*. 7:e45895.
- Pagliuca, C., V.M. Draviam, E. Marco, P.K. Sorger und P. De Wulf. 2009. Roles for the conserved spc105p/kre28p complex in kinetochore-microtubule binding and the spindle assembly checkpoint. *PLoS One*. 4:e7640.
- Palframan, W.J., J.B. Meehl, S.L. Jaspersen, M. Winey und A.W. Murray. 2006. Anaphase inactivation of the spindle checkpoint. *Science*. 313:680-4.
- Pan, J. und R.H. Chen. 2004. Spindle checkpoint regulates Cdc20p stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 18:1439-51.
- Papworth, L.C., J.C. Bauer und J. Braman. 1996. Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies*. 9:3-5.
- Park, C.J., J.E. Park, T.S. Karpova, N.K. Soung, L.R. Yu, S. Song, K.H. Lee, X. Xia, E. Kang, I. Dabanoglu, D.Y. Oh, J.Y. Zhang, Y.H. Kang, S. Wincovitch, T.C. Huffaker, T.D. Veenstra, J.G. McNally und K.S. Lee. 2008. Requirement for the budding yeast polo kinase cdc5 in proper microtubule growth and dynamics. *Eukaryot Cell*. 7:444-53.
- Park, J.E., N.K. Soung, Y. Johmura, Y.H. Kang, C. Liao, K.H. Lee, C.H. Park, M.C. Nicklaus und K.S. Lee. 2010. Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function. *Cell Mol Life Sci*. 67:1957-70.
- Passmore, L.A., C.R. Booth, C. Venien-Bryan, S.J. Ludtke, C. Fioretto, L.N. Johnson, W. Chiu und D. Barford. 2005. Structural analysis of the anaphase-promoting complex reveals multiple active sites and insights into polyubiquitylation. *Mol Cell*. 20:855-66.
- Pereira, G., T. Hofken, J. Grindlay, C. Manson und E. Schiebel. 2000. The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Mol Cell*. 6:1-10.
- Pereira, G., C. Manson, J. Grindlay und E. Schiebel. 2002. Regulation of the Bfa1p-Bub2p complex at spindle pole bodies by the cell cycle phosphatase Cdc14p. *J Cell Biol*. 157:367-79.
- Pereira, G. und E. Schiebel. 2005. Kin4 kinase delays mitotic exit in response to spindle alignment defects. *Mol Cell*. 19:209-21.
- Perzmaier, A. 2011. Die Rolle des Zellproliferationsproteins Cdc123 bei der Initiation der Translation. *Dissertation*. Universität Regensburg.
- Peter, M. und I. Herskowitz. 1994. Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science*. 265:1228-31.

- Peters, J.M.** 1998. SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol.* 10:759-68.
- Peters, J.M.** 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:644-56.
- Petronczki, M., P. Lenart und J.M. Peters.** 2008. Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev Cell.* 14:646-59.
- Pfleger, C.M. und M.W. Kirschner.** 2000. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 14:655-65.
- Pfleger, C.M., E. Lee und M.W. Kirschner.** 2001. Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* 15:2396-407.
- Pines, J.** 2011. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:427-38.
- Pinsky, B.A., C. Kung, K.M. Shokat und S. Biggins.** 2006. The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat Cell Biol.* 8:78-83.
- Pinsky, B.A., C.R. Nelson und S. Biggins.** 2009. Protein phosphatase 1 regulates exit from the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr Biol.* 19:1182-7.
- Pollard, T.D.** 2010. Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol.* 22:50-6.
- Pruyne, D., A. Legesse-Miller, L. Gao, Y. Dong und A. Bretscher.** 2004. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:559-91.
- Queralt, E., C. Lehane, B. Novak und F. Uhlmann.** 2006. Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell.* 125:719-32.
- Rahal, R. und A. Amon.** 2008. The Polo-like kinase Cdc5 interacts with FEAR network components and Cdc14. *Cell Cycle.* 7:3262-72.
- Rancati, G., V. Crispo, G. Lucchini und S. Piatti.** 2005. Mad3/BubR1 phosphorylation during spindle checkpoint activation depends on both Polo and Aurora kinases in budding yeast. *Cell Cycle.* 4:972-80.
- Ratsima, H., A.M. Ladouceur, M. Pascariu, V. Sauve, Z. Salloum, P.S. Maddox und D. D'Amours.** 2011. Independent modulation of the kinase and polo-box activities of Cdc5 protein unravels unique roles in the maintenance of genome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:E914-23.
- Rauter, H. und Y. Barral.** 2006. Cytokinesis goes polo. *Dev Cell.* 11:136-7.
- Richardson, H., D.J. Lew, M. Henze, K. Sugimoto und S.I. Reed.** 1992. Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes Dev.* 6:2021-34.
- Rock, J.M. und A. Amon.** 2009. The FEAR network. *Curr Biol.* 19:R1063-8.
- Rock, J.M. und A. Amon.** 2011. Cdc15 integrates Tem1 GTPase-mediated spatial signals with Polo kinase-mediated temporal cues to activate mitotic exit. *Genes Dev.* 25:1943-54.
- Rossio, V., E. Galati, M. Ferrari, A. Pelliccioli, T. Sutani, K. Shirahige, G. Lucchini und S. Piatti.** 2010. The RSC chromatin-remodeling complex influences mitotic exit and adaptation to the spindle assembly checkpoint by controlling the Cdc14 phosphatase. *J Cell Biol.* 191:981-97.
- Rudner, A.D. und A.W. Murray.** 2000. Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol.* 149:1377-90.
- Russell, P., S. Moreno und S.I. Reed.** 1989. Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. *Cell.* 57:295-303.
- Sadowski, I., T.C. Su und J. Parent.** 2007. Disintegrator vectors for single-copy yeast chromosomal integration. *Yeast.* 24:447-55.
- Sakchaisri, K., S. Asano, L.R. Yu, M.J. Shulewitz, C.J. Park, J.E. Park, Y.W. Cho, T.D. Veenstra, J. Thorner und K.S. Lee.** 2004. Coupling morphogenesis to mitotic entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4124-9.
- Santaguida, S. und A. Musacchio.** 2009. The life and miracles of kinetochores. *EMBO J.* 28:2511-31.
- Schwab, M., A.S. Lutum und W. Seufert.** 1997. Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell.* 90:683-93.
- Schwab, M., M. Neutzner, D. Mocker und W. Seufert.** 2001. Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC. *Embo J.* 20:5165-75.
- Schwob, E., T. Bohm, M.D. Mendenhall und K. Nasmyth.** 1994. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell.* 79:233-44.

- Schwob, E. und K. Nasmyth.** 1993. CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 7:1160-75.
- Segal, M.** 2011. Mitotic exit control: a space and time odyssey. *Curr Biol.* 21:R857-9.
- Segal, M. und K. Bloom.** 2001. Control of spindle polarity and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Cell Biol.* 11:160-6.
- Sheff, M.A. und K.S. Thorn.** 2004. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 21:661-70.
- Sherman, F. 1998. An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine. Vol. 6. VCH Publisher. 302-325.
- Shirayama, M., A. Toth, M. Galova und K. Nasmyth.** 1999. APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature.* 402:203-7.
- Shirayama, M., W. Zachariae, R. Ciosk und K. Nasmyth.** 1998. The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* 17:1336-49.
- Shou, W., R. Azzam, S.L. Chen, M.J. Huddleston, C. Baskerville, H. Charbonneau, R.S. Annan, S.A. Carr und R.J. Deshaies.** 2002. Cdc5 influences phosphorylation of Net1 and disassembly of the RENT complex. *BMC Mol Biol.* 3:3.
- Shou, W., K.M. Sakamoto, J. Keener, K.W. Morimoto, E.E. Traverso, R. Azzam, G.J. Hoppe, R.M. Feldman, J. DeModena, D. Moazed, H. Charbonneau, M. Nomura und R.J. Deshaies.** 2001. Net1 stimulates RNA polymerase I transcription and regulates nucleolar structure independently of controlling mitotic exit. *Mol Cell.* 8:45-55.
- Shou, W., J.H. Seol, A. Shevchenko, C. Baskerville, D. Moazed, Z.W. Chen, J. Jang, H. Charbonneau und R.J. Deshaies.** 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell.* 97:233-44.
- Sia, R.A., H.A. Herald und D.J. Lew.** 1996. Cdc28 tyrosine phosphorylation and the morphogenesis checkpoint in budding yeast. *Mol Biol Cell.* 7:1657-66.
- Sikorski, R.S. und P. Hieter.** 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122:19-27.
- Simpson-Lavy, K.J. und M. Brandeis.** 2011. Phosphorylation of Cdc5 regulates its accumulation. *Cell Div.* 6:23.
- Sironi, L., M. Mapelli, S. Knapp, A. De Antoni, K.T. Jeang und A. Musacchio.** 2002. Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. *EMBO J.* 21:2496-506.
- Skowrya, D., K.L. Craig, M. Tyers, S.J. Elledge und J.W. Harper.** 1997. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell.* 91:209-19.
- Snead, J.L., M. Sullivan, D.M. Lowery, M.S. Cohen, C. Zhang, D.H. Randle, J. Taunton, M.B. Yaffe, D.O. Morgan und K.M. Shokat.** 2007. A coupled chemical-genetic and bioinformatic approach to Polo-like kinase pathway exploration. *Chem Biol.* 14:1261-72.
- Song, S., T.Z. Grenfell, S. Garfield, R.L. Erikson und K.S. Lee.** 2000. Essential function of the polo box of Cdc5 in subcellular localization and induction of cytokinetic structures. *Mol Cell Biol.* 20:286-98.
- St-Pierre, J., M. Douziech, F. Bazile, M. Pascariu, E. Bonneil, V. Sauve, H. Ratsima und D. D'Amours.** 2009. Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity. *Mol Cell.* 34:416-26.
- Stegmeier, F., J. Huang, R. Rahal, J. Zmolik, D. Moazed und A. Amon.** 2004. The replication fork block protein Fob1 functions as a negative regulator of the FEAR network. *Curr Biol.* 14:467-80.
- Stegmeier, F., R. Visintin und A. Amon.** 2002. Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell.* 108:207-20.
- Stoler, S., K.C. Keith, K.E. Curnick und M. Fitzgerald-Hayes.** 1995. A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev.* 9:573-86.

- Straight, A.F., W.F. Marshall, J.W. Sedat und A.W. Murray.** 1997. Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate. *Science*. 277:574-8.
- Straight, A.F., W. Shou, G.J. Dowd, C.W. Turck, R.J. Deshaies, A.D. Johnson und D. Moazed.** 1999. Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell*. 97:245-56.
- Sullivan, M., T. Higuchi, V.L. Katis und F. Uhlmann.** 2004. Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase. *Cell*. 117:471-82.
- Sullivan, M. und D.O. Morgan.** 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:894-903.
- Sullivan, M. und F. Uhlmann.** 2003. A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit. *Nat Cell Biol*. 5:249-54.
- Surana, U., H. Robitsch, C. Price, T. Schuster, I. Fitch, A.B. Futcher und K. Nasmyth.** 1991. The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell*. 65:145-61.
- Tanaka, T.U., M.J. Stark und K. Tanaka.** 2005. Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:929-42.
- Taniguchi, E., F. Toyoshima-Morimoto und E. Nishida.** 2002. Nuclear translocation of plk1 mediated by its bipartite nuclear localization signal. *J Biol Chem*. 277:48884-8.
- Teichner, A., E. Eytan, D. Sitry-Shevah, S. Miniowitz-Shemtov, E. Dumin, J. Gromis und A. Hershko.** 2011. p31comet Promotes disassembly of the mitotic checkpoint complex in an ATP-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:3187-92.
- Thornton, B.R., T.M. Ng, M.E. Matyskiela, C.W. Carroll, D.O. Morgan und D.P. Toczyski.** 2006. An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*. 20:449-60.
- Thornton, B.R. und D.P. Toczyski.** 2003. Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC. *Nat Cell Biol*. 5:1090-4.
- Tian, W., B. Li, R. Warrington, D.R. Tomchick, H. Yu und X. Luo.** 2012. Structural analysis of human Cdc20 supports multisite degron recognition by APC/C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:18419-24.
- Toczyski, D.P., D.J. Galgoczy und L.H. Hartwell.** 1997. CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell*. 90:1097-106.
- Tomson, B.N., R. Rahal, V. Reiser, F. Monje-Casas, K. Mekhail, D. Moazed und A. Amon.** 2009. Regulation of Spo12 phosphorylation and its essential role in the FEAR network. *Curr Biol*. 19:449-60.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon.** 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*. 24:145-9.
- Traverso, E.E., C. Baskerville, Y. Liu, W. Shou, P. James, R.J. Deshaies und H. Charbonneau.** 2001. Characterization of the Net1 cell cycle-dependent regulator of the Cdc14 phosphatase from budding yeast. *J Biol Chem*. 276:21924-31.
- Tschochner, H. und E. Hurt.** 2003. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol*. 13:255-63.
- Tyers, M., G. Tokiwa und B. Futcher.** 1993. Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J*. 12:1955-68.
- Uzunova, K., B.T. Dye, H. Schutz, R. Ladurner, G. Petzold, Y. Toyoda, M.A. Jarvis, N.G. Brown, I. Poser, M. Novatchkova, K. Mechtler, A.A. Hyman, H. Stark, B.A. Schulman und J.M. Peters.** 2012. APC15 mediates CDC20 autoubiquitylation by APC/C(MCC) and disassembly of the mitotic checkpoint complex. *Nat Struct Mol Biol*.
- Valerio-Santiago, M. und F. Monje-Casas.** 2011. Tem1 localization to the spindle pole bodies is essential for mitotic exit and impairs spindle checkpoint function. *J Cell Biol*. 192:599-614.
- Vidanes, G.M., F.D. Sweeney, S. Galicia, S. Cheung, J.P. Doyle, D. Durocher und D.P. Toczyski.** 2010. CDC5 inhibits the hyperphosphorylation of the checkpoint kinase Rad53, leading to checkpoint adaptation. *PLoS Biol*. 8:e1000286.
- Visintin, C., B.N. Tomson, R. Rahal, J. Paulson, M. Cohen, J. Taunton, A. Amon und R. Visintin.** 2008. APC/C-Cdh1-mediated degradation of the Polo kinase Cdc5 promotes the return of Cdc14 into the nucleolus. *Genes Dev*. 22:79-90.

- Visintin, R., K. Craig, E.S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers und A. Amon.** 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell.* 2:709-18.
- Visintin, R., E.S. Hwang und A. Amon.** 1999. Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature.* 398:818-23.
- Visintin, R., F. Stegmeier und A. Amon.** 2003. The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization. *Mol Biol Cell.* 14:4486-98.
- Vodermaier, H.C., C. Gieffers, S. Maurer-Stroh, F. Eisenhaber und J.M. Peters.** 2003. TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Curr Biol.* 13:1459-68.
- Wäsch, R. und F.R. Cross.** 2002. APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature.* 418:556-62.
- Weissman, A.M.** 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:169-78.
- Winey, M. und B.J. Huneycutt.** 2002. Centrosomes and checkpoints: the MPS1 family of kinases. *Oncogene.* 21:6161-9.
- Woodbury, E.L. und D.O. Morgan.** 2007. Cdk and APC activities limit the spindle-stabilizing function of Fin1 to anaphase. *Nat Cell Biol.* 9:106-12.
- Yaakov, G., K. Thorn und D.O. Morgan.** 2012. Separase biosensor reveals that cohesin cleavage timing depends on phosphatase PP2A(Cdc55) regulation. *Dev Cell.* 23:124-36.
- Yeong, F.M., H.H. Lim, C.G. Padmashree und U. Surana.** 2000. Exit from mitosis in budding yeast: biphasic inactivation of the Cdc28-Clb2 mitotic kinase and the role of Cdc20. *Mol Cell.* 5:501-11.
- Yoshida, S., K. Kono, D.M. Lowery, S. Bartolini, M.B. Yaffe, Y. Ohya und D. Pellman.** 2006. Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science.* 313:108-11.
- Yoshida, S. und A. Toh-e.** 2002. Budding yeast Cdc5 phosphorylates Net1 and assists Cdc14 release from the nucleolus. *Biochem Biophys Res Commun.* 294:687-91.
- Yuste-Rojas, M. und F.R. Cross.** 2000. Mutations in CDC14 result in high sensitivity to cyclin gene dosage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 263:60-72.
- Zachariae, W., M. Schwab, K. Nasmyth und W. Seufert.** 1998. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science.* 282:1721-4.
- Zeng, X., J.A. Kahana, P.A. Silver, M.K. Morpew, J.R. McIntosh, I.T. Fitch, J. Carbon und W.S. Saunders.** 1999. Slk19p is a centromere protein that functions to stabilize mitotic spindles. *J Cell Biol.* 146:415-25.
- Zhang, Y. und E. Lees.** 2001. Identification of an overlapping binding domain on Cdc20 for Mad2 and anaphase-promoting complex: model for spindle checkpoint regulation. *Mol Cell Biol.* 21:5190-9.
- Zhu, G., P.T. Spellman, T. Volpe, P.O. Brown, D. Botstein, T.N. Davis und B. Futcher.** 2000. Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature.* 406:90-4.
- Zich, J. und K.G. Hardwick.** 2009. Getting down to the phosphorylated 'nuts and bolts' of spindle checkpoint signalling. *Trends Biochem Sci.* 35:18-27.
- Zimniak, T., V. Fitz, H. Zhou, F. Lampert, S. Opravil, K. Mechtler, P. Stolt-Bergner und S. Westermann.** 2012. Spatiotemporal regulation of Ipl1/Aurora activity by direct Cdk1 phosphorylation. *Curr Biol.* 22:787-93.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des Zellteilungszyklus in <i>S. cerevisiae</i>	19
Abbildung 3.2 Regulation der Phosphatase Cdc14 und des Austritts aus der Mitose	29
Abbildung 3.3 MCC-Bildung und APC ^{Cdc20} -Inhibierung an unbesetzten Kinetochoren	34
Abbildung 3.4 Sequenzvergleich der Polo-Kinasen Cdc5 aus <i>S. cerevisiae</i> , Polo aus <i>D. melanogaster</i> und der humanen Plk1	39
Abbildung 3.5 Schematischer Aufbau der Polo-Kinase Cdc5	40
Abbildung 3.6 Lokalisation von Cdc5 während des Zellteilungszyklus	41
Abbildung 4.1 Fluktuation von Cdc5 und Cdc5ΔN während des Zellteilungszyklus.....	46
Abbildung 4.2 N-terminaler Bereich von Cdc5 und das Fusionsprotein Cdc5N80-GFP	47
Abbildung 4.3 Der N-terminale Bereich von Cdc5 ist hinreichend für Instabilität in der G1-Phase und Lokalisation im Zellkern	48
Abbildung 4.4 KEN-Box trägt mehr zur Instabilität von Cdc5 bei als die beiden D-Boxen	53
Abbildung 4.5 Mutation der D-Boxen beeinflusst die Lokalisation von Cdc5N80-GFP im Zellkern..	54
Abbildung 4.6 Cdc5N80db1/2-GFP-NLS lokalisiert hauptsächlich im Zellkern, Cdc5N80-GFP-NES dagegen im Zytoplasma	56
Abbildung 4.7 Kernlokalisation ist notwendig für den Abbau von Cdc5N80-GFP in G1.....	59
Abbildung 4.8 Co-Lokalisation von Cdc5N80-GFP-Derivaten mit Kern-, Histon- und Nukleolus-Markern.....	60
Abbildung 4.9 Lokalisation in Substrukturen des Zellkerns verzögert den Abbau in G1.....	62
Abbildung 4.10 Komplementation von <i>cdc5-Δ</i> durch <i>cdc5pm</i> -Derivate	64
Abbildung 4.11 Komplementation von <i>cdc5-Δ</i> durch endogene Mengen der <i>CDC5</i> -Derivate	67
Abbildung 4.12 Instabilität von Cdc5N80pm1/2-GFP in der M-Phase	69
Abbildung 4.13 Lokalisation der Cdc5-GFP-Derivate während des Zellteilungszyklus	70
Abbildung 4.14 Genetische Interaktion von <i>cdc5pm1/2</i> mit <i>clb2-Δ</i>	72
Abbildung 4.15 Genetische Interaktion von <i>cdc5pm1/2</i> und <i>CDC14</i> ^{HA10}	73
Abbildung 4.16 Cdc14-Überexpression supprimiert den Phänotyp von <i>cdc5pm1/2</i> -Mutanten.....	74
Abbildung 4.17 Cdc14-Freisetzung und Spindel-Elongation sind in der <i>cdc5pm1/2</i> -Mutante beeinträchtigt.....	76
Abbildung 4.18 Cdc5pm1/2 kann die Cdc14-Phosphorylierung etwas schlechter induzieren	77
Abbildung 4.19 Zellzyklusspezifische Phosphorylierung von Scc1 und Bfa1 in der <i>cdc5pm1/2</i> -Mutante	79
Abbildung 4.20 Cdc5 lokalisiert unabhängig von Bfa1 am SPK	81
Abbildung 4.21 Überexpression von Cdc5 deaktiviert das Spindelkontrollsystem	84

Abbildung 4.22 Überexpression von Cdc5 verhindert die Cdc20-Mad2-Interaktion	86
Abbildung 4.23 Überexpression von Cdc5 hat keinen Einfluss auf Mad1-Mad2-Interaktion	88
Abbildung 4.24 Kinetochor-Cluster co-lokalisiert mit SPK in Nocodazol-arretierten Zellen	89
Abbildung 4.25 Mad1-Foci co-lokalisieren überwiegend mit unbesetzten Kinetochoren	90
Abbildung 4.26 Überexpression von Cdc5 verringert die Kinetochor-Lokalisation von Mad1-GFP...	91
Abbildung 4.27 Mad2-Lokalisation am unbesetzten Kinetochor wird durch Cdc5-Überexpression reduziert	93
Abbildung 4.28 Kinetochor-Lokalisation von Mad3 und Bub3 im SAC nach Cdc5-Überexpression .	94
Abbildung 4.29 Cdc20 aber nicht Cdc23 co-lokalisiert mit unbesetztem Kinetochor	96
Abbildung 4.30 Mad2-GFP-Lokalisation in <i>mad1-Δ</i> Zellen	96
Abbildung 4.31 Kinetochor-Lokalisation von Mad1, Mad2, Bub3 und Mad3 in Abhängigkeit voneinander	98
Abbildung 4.32 Überexpression von Cdc5 reduziert die Anzahl der Zellen mit unbesetztem Kinetochor	100
Abbildung 4.33 Slk19-Lokalisation wird durch Cdc5-Überexpression beeinflusst	101
Abbildung 4.34 Slk19 trägt zur Lokalisation von Mad1 am unbesetzten Kinetochor bei	102
Abbildung 4.35 Cdc5-Überexpression wirkt der Mps1-Überexpression entgegen	103
Abbildung 4.36 Mps1 ist ein potentielles Zielprotein von Cdc5	104
Abbildung 4.37 Cdc5 ist in Nocodazol-arretierten Zellen stabil und co-lokalisiert nicht mit dem unbesetzten Kinetochor	105
Abbildung 5.1 Potentielle NLS in der N-terminalen Domäne von Cdc5	109
Abbildung 5.2 Sequenzvergleich der N-terminalen Domäne von Cdc5 mit verwandeten Polo-Kinasen aus Hefen	116
Abbildung 6.1 Integration eines integrativen Plasmids durch homologe Rekombination	127
Abbildung 6.2 Einfachintegration eines DNA-Konstrukts mittels <i>disintegrator</i> Plasmid	128

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 7.1 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme	143
Tabelle 7.2 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Vektoren	151
Tabelle 7.3 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidsequenzen	153

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Lea Dominika Maria Arnold
Anschrift	Untere Bachgasse 2, 93047 Regensburg
geboren am	06.11.1983 in Regensburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Promotion

02/2009 – 12/2012	Universität Regensburg, Lehrstuhl für Genetik, Prof. Dr. Wolfgang Seufert Titel: Studien zur Regulation und Funktion der Polo-Kinase Cdc5 im Zellteilungszyklus der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mitglied der Regensburg International Graduate School of Life Sciences Vortrag: Cell cycle control of yeast polo kinase instability, September 2010, 1 st Summer Academy of the Regensburg International Graduate School of Life Sciences, Kloster Kostenz Vortrag: Cell cycle control of yeast polo kinase instability März 2010, 33 rd Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Regensburg Poster: A KEN box dominates the cell cycle-regulated instability of the yeast polo kinase Cdc5 März 2012, 35 th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Dresden Poster: Live-cell-analysis of yeast polo kinase stability, September 2011, 2 nd Summer Academy of the Regensburg International Graduate School of Life Sciences, Kloster Kostenz Poster: Cell cycle control of yeast polo kinase instability März 2010, 33 rd Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Regensburg
-------------------	---

Berufliche Erfahrung

06/2008 – 08/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Genetik, Universität Regensburg
-------------------	---

LEBENS LAUF

Studium

10/2003 – 05/2008

Studium der Biologie, Universität Regensburg

Abschluss: **Diplom Biologin** (Note: 1,1)

Titel der Diplomarbeit: Regulation der Polo-Kinase Cdc5 im Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Schulbildung

1994 – 2003

Von-Müller-Gymnasium, Regensburg

Abschluss: **Allgemeine Hochschulreife**

1990 – 1994

Grundschule Prüfening, Regensburg

Soziales Engagement

Seit 1998

Ehrenamtliche Tätigkeit in der Jugendarbeit der Pfarrei St. Bonifaz, Regensburg

Danke

Mein ganz besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Wolfgang Seufert** für die Bereitstellung meines Themas und die hervorragende Betreuung. Die vielen Diskussionen waren immer sehr hilfreich und motivierend. Vielen Dank!

Bei **Prof. Dr. Frank Sprenger** möchte ich mich für die Begutachtung meiner Arbeit bedanken. Mein Dank geht auch an die weiteren Mitglieder meiner Prüfungskommission, **Prof. Dr. Stephan Schneuwly**, **Prof. Dr. Herbert Tschochner** und **PD Dr. Joachim Griesenbeck**. Für die Begleitung meiner Promotion als Mentoren, danke ich Prof. Dr. Frank Sprenger und Prof. Dr. Herbert Tschochner.

Vielen Dank an Prof. Dr. Frank Sprenger, Christoph Morgenthaler und Britta Swoboda für die Unterstützung und Hilfeleistung bei der Mikroskopie.

Meinen lieben Laborkollegen und Freunden **Britta Swoboda** und **Sebastian Höckner** möchte ich für die schöne Zeit, die hilfreichen Diskussionen, die Aufmunterungen und die super Laboratmosphäre danken. Britti, dir danke ich besonders für die gemeinsamen Jahre.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Genetik gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Ein besonderer Dank geht an Dr. Michael Schwab und Dr. Heidi Richter für die vielen guten Ratschläge und die Unterstützung bei kleinen und großen Problemen. Bei Sebastian Bittner und Larissa Gaub bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Mein letzter Dank geht von ganzem Herzen an meine Freunde und meine Familie. Meinen liebevollen **Eltern** möchte ich für ihre grenzenlose Unterstützung und dass sie immer für mich da sind danken. **Philipp**, dir danke ich für deine Geduld, wenn es im Labor mal wieder länger gedauert hat, deine Liebe, deinen Zuspruch und deine Unterstützung.